

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**Respuesta homeostática e inducción de cambios
de identidad tras ablaciones en *Drosophila
melanogaster***

Memoria presentada por

Salvador Cenador Herrera

para optar al grado de Doctor en Ciencias por
la Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 2012

Director de Tesis:
Prof. Ginés Morata Pérez

Tutora de la Tesis:
Prof. Sonsoles Campuzano Corrales

A mi madre y a mi hermano

Índice

R. RESUMEN/SUMMARY	1
I. INTRODUCCION	7
I1. La biología del desarrollo y la regeneración	9
I2. <i>Drosophila melanogaster</i>	11
I3. La información posicional en el desarrollo	12
I4. Regulación epigenética de la identidad posicional	14
I5. Los discos imaginales	16
I6. La apoptosis	19
I7. La regeneración en el reino animal	21
I8. La regeneración en <i>D. Melanogaster</i>	24
O. OBJETIVOS	27
M. MATERIALES Y METODOS	31
R. RESULTADOS	43
R1. Respuesta sistémica e inmediata en la reconstrucción de dominios abiertos: el pouch del ala	45
R1a. <i>Estudio del efecto de diferentes factores pro-apoptóticos</i>	45
R1b. <i>Efectos de la duración del tratamiento de ablación</i>	47
R1c. <i>La reconstrucción del ala es realizada por células ajenas al pouch de forma simultánea a la ablación</i>	48
R1d. <i>Ablación y reconstrucción del dominio sal</i>	53
R1e. <i>El marcaje de células exteriores al dominio rn corrobora el origen de las células que lo reconstruyen</i>	55
R1f. <i>Durante la reconstrucción del pouch tienen lugar reordenamientos celulares.</i>	57
R1g. <i>La ablación del dominio rn provoca una respuesta proliferativa sistémica en todo el disco imaginal de ala</i>	57
R1h. <i>La actividad de la vía JNK es necesaria en las células que reconstruyen el pouch</i>	61

R2. Reconstrucción de dominios de linaje cerrados: cambios de identidad de compartimento	63
R2a. <i>Los compartimentos como dominios cerrados</i>	63
R2b. <i>Ablación del compartimento posterior del ala</i>	64
R2c. <i>Las células del compartimento anterior son capaces de participar en la reconstrucción del posterior</i>	66
R2d. <i>Las células pueden cambiar de identidad en la reconstrucción del borde dorso-ventral</i>	69
R2e. <i>El borde A/P pierde su tensión facilitando que las células de ambos compartimentos se entremezclen</i>	71
R2f. <i>Respuesta proliferativa a la ablación del compartimento posterior</i>	72
R2g. <i>La actividad de los complejos Polycomb y trithorax se modifica en el borde A/P para permitir los cambios de identidad celular</i>	75
R3. Los cambios de identidad celular que ocurren tras una ablación pueden ser inducidos de forma no-autónoma	79
R2a. <i>Los compartimentos como dominios cerrados</i>	79
R3b. <i>El gen de identidad engrailed puede ser inducido de forma no autónoma</i>	81
R3c. <i>El gen Ultrabithorax también puede ser inducido de forma no autónoma</i>	83
D. DISCUSION	85
D1. <i>En dominios de linaje abierto la inducción de muerte masiva provoca una respuesta homeostática inmediata que mantiene la integridad del epitelio</i>	88
D2. <i>Los cambios colectivos de identidad celular permiten la reconstrucción de estructuras perdidas</i>	88
D3. <i>Respuesta proliferativa y control del tamaño</i>	92
D4. <i>El tipo de daño en el tejido pueden activar diferentes respuestas</i>	95
D5. <i>El papel de la vía JNK</i>	97
D6. <i>Los discos imaginales como modelo de homeostasis y regeneración</i>	98
C. CONCLUSIONES/CONCLUSSIONS	99
REFERENCIAS	105
ANEXO I: ABREVIATURAS	117
ANEXO II: AGRADECIMIENTOS	121
ANEXO III: PUBLICACIONES	131

Г. РЕЗУМЕН / SUMMARY

Muchos organismos han desarrollado diversos mecanismos para restaurar tejidos dañados, órganos o estructuras amputadas. El estudio experimental de la regeneración se encuentra muchas veces limitado por los propios organismos modelo usados en estos estudios, como anfibios, planarias o hidras. El estudio de la regeneración en otros organismos modelo como *Drosophila* pueden contribuir a la comprensión del fenómeno.

Empleando sistemas condicionales de expresión hemos inducido muerte celular masiva en diferentes dominios del disco imaginal de ala. Nuestros resultados indican que el daño provoca una respuesta inmediata y simultánea de reparación en el tejido, que garantiza la integridad del epitelio. Esta respuesta incluye un incremento de la proliferación de todas las regiones del disco y la activación de la ruta JNK en las células que reconstruyen el dominio.

Uno de los aspectos más intrigantes de la regeneración es cómo y en qué medida las células que reparan el tejido dañado adquieren nuevas potencialidades de desarrollo y cambian su determinación original. Empleando los bordes de compartimento para ensayar cambios de determinación, hemos encontrado que tras una eliminación masiva de células de un compartimento tiene lugar un colapso transitorio del borde, permitiendo que células a ambos lados cambien su identidad. Hemos descubierto que este proceso depende de modificaciones en la actividad de los complejos PcG y trxG, involucrados en el control de la expresión de genes del desarrollo.

Para entender el mecanismo que está detrás de la adquisición de nuevas identidades, hemos realizados experimentos en los que simulamos las condiciones en las que las células del disco cambian su identidad tras el colapso del borde de compartimentos. Hemos encontrado que si se encuentran rodeadas de células de identidad posterior, las células del compartimento anterior pueden cambiar su identidad a posterior. Este mecanismo nos ofrece una explicación al cambio de determinación durante la regeneración. También supone un nuevo descubrimiento sobre el modo en el que se activan los genes del desarrollo, pues sugiere que durante el desarrollo del organismo, grupos de células pueden adquirir nuevos estados de determinación por decisiones colectivas.

Many organisms have developed mechanisms to restore damaged tissues, organs or amputated structures. The experimental analysis of the regeneration process is often handicapped by limitations imposed by the model organisms, amphibians, planarians, hydras, classically used in those studies. The study of regeneration in other model organisms like *Drosophila* may produce new insights into the phenomenon.

Using conditional expression systems we have induced massive cell killing in different domains of the wing imaginal discs. Our results indicate that the damage provokes an immediate and simultaneous response aimed to repair the tissue, thus guaranteeing the integrity of the epithelium. This response includes an increase in cell proliferation in all regions of the disc and the activation of the JNK activation in the cells that reconstruct the domain.

One of the most intriguing aspects of regeneration is how and to what extent the cells that repair the damaged tissue acquire new developmental potential and change their original determination. Using the compartment boundaries to assay changes of determination, we find that massive cell killing in a compartment provokes a transient collapse of compartments boundaries, allowing cells from either side of the border to change their identity. We find that this process is associated with transient down regulation of the activity of the gene complexes (PcG and trxG) involved in the control of the expression of identity genes.

To understand the mechanism behind the acquisition of the new identities, we have carried out experiments in which we simulate the conditions in which the wing disc cells change their identity after the collapse of compartment borders. We find that if surrounded by cells of posterior identity, anterior compartment cells can change their identity to posterior. This mechanism provides an explanation of the change of determination during regeneration. It also provides new insights into the mode of activation of developmental genes, as it suggests that during development groups of cells may acquire new states of determination by group decision.

i. introducción

1. LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y LA REGENERACIÓN

Uno de los mayores hitos en la historia evolutiva fue la adquisición de la multicelularidad por parte de los metazoos hace 535 millones de años. El salto a la multicelularidad, alcanzado en hasta 16 ocasiones independientes dentro de 3 reinos (*fungi*, *plantae* y *animalia*), permitió la especialización celular: determinadas células pueden desempeñar funciones complejas gracias a que otras se encargan de su nutrición y sostenimiento. Gracias a ello, aparecieron avances evolutivos como estructuras especializadas, la posibilidad de sintetizar proteínas complejas y costosas energéticamente (como el colágeno) y los organismos colonizaron el medio terrestre (Dyson, 1997; Brooke and Holland, 2003; Pfeiffer and Bonhoeffer, 2003).

Los organismos multicelulares se caracterizan por disponer de un plan corporal concreto, o bauplan. La existencia de estos planes corporales depende de que los organismos posean un programa definido y ordenado de control del crecimiento y de adquisición de especialización celular. Este programa ontogenético es el que guía al cigoto, una célula indiferenciada, hasta alcanzar su forma adulta en la que puede reproducirse, perpetuando así su bauplan y la vida. La biología del desarrollo se encarga de estudiar este conjunto de procesos ontogenéticos que acaban conformando el plan

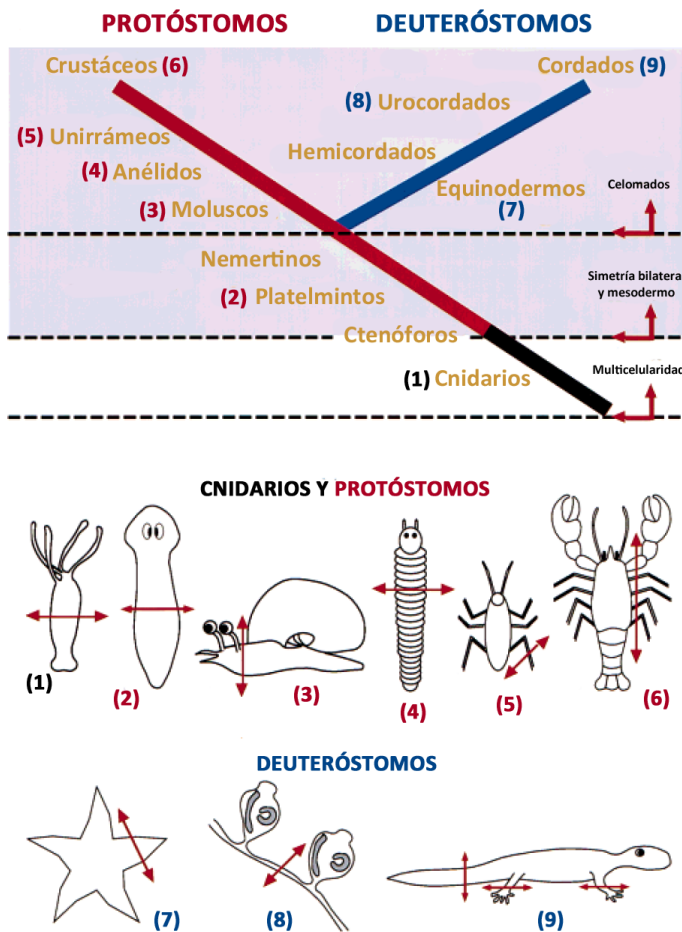


Figura I1. La regeneración es una capacidad presente en todo el árbol evolutivo de los metazoos. Sobre un árbol filogenético de los metazoos se muestran ejemplos de cómo en cada phyla se conoce al menos un ejemplo de organismo con capacidades de regeneración: 1. Hidra; 2. Planarias; 3. Moluscos; 4. Poliquetos; 5. Apéndices de insectos; 6. Apéndices de cangrejos; 7. Estrellas de mar; 8. Ascidias; 9. Salamandras. Las flechas rojas indican los planos de amputación que permiten la reconstrucción (Modificado de Sánchez-Alvarado, 2000).

corporal de cada organismo.

No obstante, el proceso de diferenciación, esta especialización celular, tiene un coste elevado: la pérdida de un grupo de células o una estructura completa puede comprometer la supervivencia del resto del organismo. Durante su etapa de crecimiento el organismo puede enfrentarse a fallos de diferenciación o a la muerte accidental de células críticas para que continúe el programa de desarrollo. Durante su vida adulta, se pueden originar situaciones como amputaciones a causa de depredadores, accidentes físicos, destrucción de células por infecciones o simple desgaste de epitelios. Si los planes de desarrollo fueran rígidos e irreversibles, la destrucción de una parte del organismo, por pequeña que fuera, acabaría con el organismo completo. Por ello, forman parte intrínseca de la misma multicelularidad

los fenómenos de homeostasis y regeneración: la capacidad de acomodarse a injerencias del medio o contingencias e incluso la reactivación del programa de desarrollo para reconstruir una parte perdida. Se cree, de hecho, que la regeneración es un rasgo originado a la vez que la aparición de los metazoos (una sinapomorfia), y que se ha conservado en diferentes grados dentro de cada taxón (Sánchez Alvarado, 2000) (Figura i1).

Uno de los mayores descubrimientos que ha hecho la biología del desarrollo es que pese a la vasta variedad de estructuras, patrones de crecimiento y planes corporales presentes en los seres vivos, en realidad los procesos y vías de señalización implicados están altamente conservados. Parece, más bien, que un número limitado de diseños y recursos se han reutilizado repetidamente durante la

evolución (Lawrence, 1992; Holland, 1999; Carroll et al., 2001). Esta universalidad de procesos es lo que permite utilizar organismos modelo para caracterizar fenómenos que luego pueden ser extrapolados a organismos más complejos o incluso a enfermedades humanas. Entre los organismos modelo más ampliamente usados están el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra *Danio rerio*, el ratón *Mus musculus* y el empleado en esta tesis: la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*.

i2.. DROSOPHILA MELANOGASTER

Tras ser descrita originalmente por los entomólogos Johann Wilhem Meigen y Joseph Albert Lintner en el siglo XIX, *Drosophila* empezó a ser utilizada como organismo modelo por la escuela de Thomas Hunt Morgan a comienzos del siglo XX. Tras un siglo de su estudio y empleo como modelo se ha alcanzado un nivel muy profundo de conocimiento de su biología y genética, lo que ha llevado a desarrollar multitud de herramientas genéticas y moleculares para el estudio de problemas biológicos. Entre otras, sus ventajas como modelo son: un ciclo vital muy corto (10 días a 25°C, ver Fig. i2); facilidad de almacenamiento (mide 3mm) y mantenimiento; carece en gran medida de la redundancia genética de mamíferos, facilitando el estudio de fenotipos mutantes (pues suelen bastar mutaciones individuales para que se manifieste un fenotipo); gracias a los cromosomas balanceadores (cromosomas aberrantes que impiden la recombinación meiótica) pueden mantenerse estirpes mutantes durante muchas generaciones; su genoma fue además uno de los primeros en ser secuenciado (Adams et al., 2000); en las últimas décadas se han

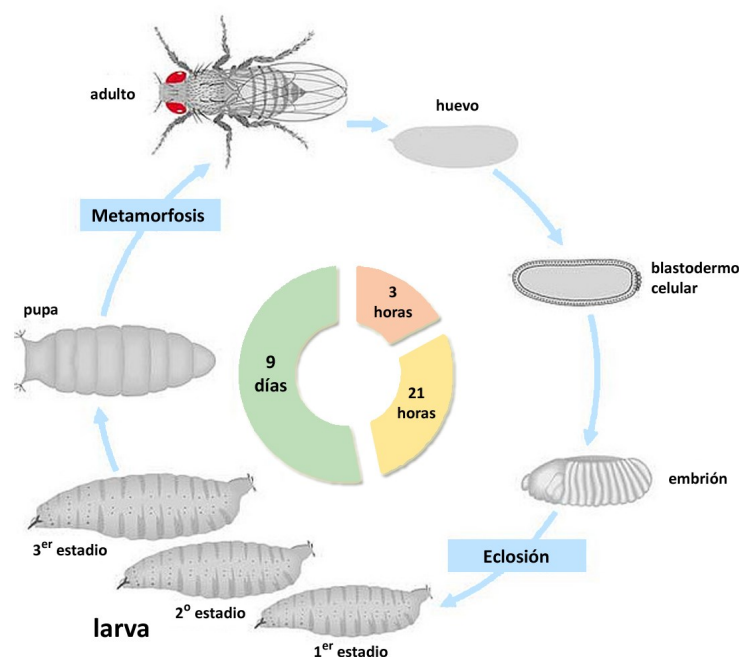


Figura i2. El ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. El ciclo vital de *D. melanogaster* dura 10 días a una temperatura de cultivo de 25°C. Consta de una fase embrionaria, 3 estadios larvarios y una fase de pupa en la que realiza metamorfosis completa, de la que eclosiona un individuo adulto fértil (Tomado de B. Staveley).

desarrollado herramientas que permiten el control espacial y temporal de la actividad de cualquier gen, lo que facilita el estudio de las relaciones genéticas durante la morfogénesis.

El programa de desarrollo de *Drosophila* es holometábolo (atraviesa una metamorfosis completa) y está dividido en 3 fases (Fig. i2). Las primeras 24 horas corresponden al desarrollo embrionario, que culmina con la eclosión del huevo. Sigue un periodo larvario de 3 estadios (separados entre sí por una muda de la cutícula) de unos 4 días, en los que unas estructuras denominadas discos imaginales crecen en su interior. Al finalizar el último estadio empieza la fase de pupa dentro de la cual tiene lugar la metamorfosis, durante la que muchos tejidos larvarios son reabsorbidos y sustituidos. En el caso de la cutícula de la cabeza y tórax, son los discos imaginales los que inician un proceso de diferenciación para componer el exoesqueleto (el abdomen lo construyen otros grupos de células llamados nidos de histoblastos). Tras esta fase pupal, de en torno a 5 días, emerge un individuo adulto, o imago (Lawrence, 1992).

1.3. LA INFORMACIÓN POSICIONAL EN EL DESARROLLO

Un aspecto esencial durante la ejecución de un plan corporal es que cada célula debe conocer su posición dentro del organismo para realizar el programa de diferenciación apropiado. El sistema que emplean los organismos para informar a sus células de su localización es generar un sistema de coordenadas en función de la concentración en cada punto de uno o varios gradientes de morfógenos. En *Drosophila*, el primer eje en formarse es el antero-posterior (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Frohnhofer et al., 1986). La polaridad inicial la determinan los gradientes de mRNA de dos factores, *bicoid* y *nanos* (llamados genes maternos) depositados en extremos opuestos del embrión por la madre. Las proteínas que codifican estos genes desencadenan una cascada de activación de genes zigóticos: los “gap” en primer lugar y a consecuencia de ellos los “pair rule”, que se establecen en bandas definidas a lo largo del eje A/P (Fig. i3A). La expresión de estos genes es transitoria y desaparece poco después de activarse, pero en sus zonas de expresión delimitan la de otros 2 grupos de genes: los de polaridad segmental y los genes Hox.

Estos dos tipos de genes, denominados también genes selectores, funcionan como señales binarias de encendido o apagado (Garcia-Bellido, 1975; Mann and Morata, 2000) y poseen mecanismos que garantizan que, una vez activados, su expresión se perpetúe en el tiempo, manteniendo las células la información posicional a lo largo de toda la vida del individuo. Para los genes de polaridad segmental, la actividad antagónica de los genes “pair-rule” *fushi tarazu* y *odd*

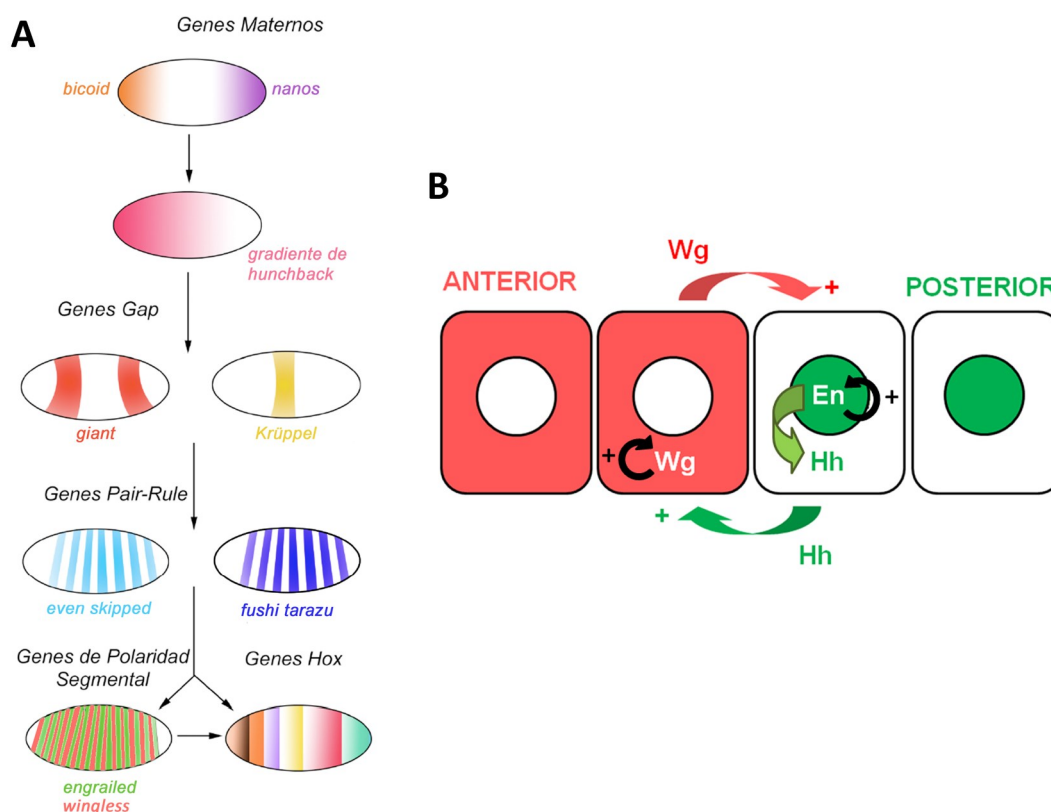


Figura 13. Regulación génica implicada en la adquisición de identidad dentro del eje A/P. (A) Las proteínas, como Hunchback, codificadas por gradientes de mRNAs maternos, activan secuencialmente los genes zigóticos “gap” (como *giant* y *Krüppel*) y los “pair rule” (como *even-skipped* o *fushi tarazu*). Estos últimos desencadenan la activación en bandas de los genes de polaridad segmental (*wingless* y *engrailed*) y todos ellos a los Hox, con patrones discretos a lo largo del eje antero-posterior (Cedido por Daniel L. Garaulet). **(B)** El mecanismo de determinación de identidades anterior y posterior en el embrión comienza cuando bandas de células adquieren la expresión de *engrailed* (*en*), a causa de la actividad de los genes “pair rule”. La actividad *en* induce la de *hedgehog* (*hh*), que codifica una proteína difusible que en las células sin actividad en desencadena la activación de *wingless* (*wg*). Recíprocamente, *Wg* difunde y refuerza la actividad de *en* en las células que ya lo expresaban. Como además *wg* y *en* retro-alimentan su propia actividad positivamente se alcanza una situación irreversible de células con actividad exclusivamente de *wg* (compartimento anterior) o de *en* (compartimento posterior).

skipped, dispuestos en franjas alternas, determinan el posicionamiento de 14 bandas de expresión de *engrailed* (DiNardo and O'Farrell, 1987). El gen *engrailed* (*en*) otorga identidad posterior a las células, y a través de la expresión del morfógeno difusible Hedgehog activa la expresión de *wingless* (*wg*) en las células vecinas, otorgándoles identidad anterior (Fig. i3B) (Morata, 2001). De hecho, la mera expresión ectópica de *engrailed* en células anteriores es suficiente para transformarlas en posteriores y generar un nuevo borde de compartimento (Guillen et al., 1995; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995).

Gracias a que ambas identidades son excluyentes y a que se retroalimentan positivamente (Fig. i3B), las células toman una decisión de identidad, aun a pesar de que, como hemos explicado, desaparezca la expresión de los “pair-rule” (Lawrence and Struhl, 1996; Mann and Morata, 2000). Este

mecanismo permite que queden definidas así en cada segmento dos poblaciones de células: los compartimentos anterior y posterior (Morata and Lawrence, 1975; Lawrence and Morata, 1976) que actúan como unidades de desarrollo. Una vez que esta identidad queda fijada en una célula, se perpetúa a través su linaje: todas las células descendientes de ésta formarán parte del mismo compartimento, y en cada momento del desarrollo, todas las células de un determinado compartimento lo son únicamente porque descienden de células del mismo compartimento.

Por su parte, el otro tipo de genes selectores que mencionamos, los genes Hox, son los responsables de especificar el eje antero-posterior de todos los animales que poseen este eje de simetría (Finnerty, 2003). Así, por ejemplo, puede fijarse la posición sobre la que se desarrolla una estructura como el disco imaginal de ala (ver más adelante) por una combinación concreta de genes Hox de los complejos *Antennapedia* y *bithorax* que se da en el borde entre los parasegmentos 5 y 6 (Lawrence and Struhl, 1996; Mann and Morata, 2000).

14. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA IDENTIDAD POSICIONAL

Como hemos mencionado, los genes que establecen la polaridad del eje A/P se expresan de forma transitoria, sólo durante las 4 primeras horas de la embriogénesis (Jackle et al., 1992). Para fijar ésta y otras decisiones genéticas que toman las células durante desarrollo, existe otro mecanismo implicado en el mantenimiento de estados activados o inactivados: el que desempeñan los genes del grupo *Polycomb* (PcG) y los del grupo *trithorax* (trxG). Los genes PcG son requeridos para el mantenimiento del estado transcripcional reprimido de los genes Hox (Lewis, 1978), mientras que los trxG están implicados en mantener su estado activo (Kennison and Tamkun, 1988; Schuettengruber et al., 2011). De forma análoga, genes implicados en identidad de compartimento como *en* o *hh* también mantienen su estado de represión por los genes PcG (Busturia and Morata, 1988; Kassis, 1994) y de activación por los trxG (Breen et al., 1995; Bejarano and Milan, 2009).

Los genes de estos grupos codifican proteínas nucleares asociadas a la cromatina, de expresión ubicua y que actúan como señales de memoria, permitiendo que un estado de activación o represión de un gen se mantenga a largo plazo y de forma heredable en las células hijas (Kennison, 1995; Pirrotta, 1995; Schwartz and Pirrotta, 2007; Beisel and Paro, 2011). De hecho, esta función es requerida no solo durante la embriogénesis, sino durante todo el proceso del desarrollo (Busturia and Morata, 1988).

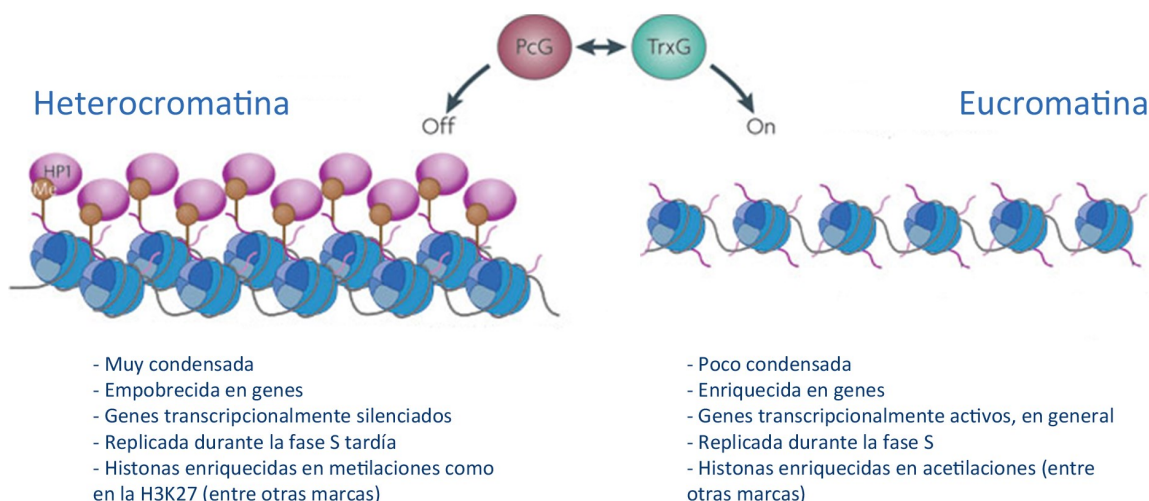


Figura I4. Diferencias entre la eucromatina y la heterocromatina. Los complejos PcG se son los responsables de mantener el DNA en forma de heterocromatina constitutiva, silenciado la expresión de genes implicados en el desarrollo, mientras que los complejos trxG mantienen el DNA en forma de eucromatina, en la que estos genes son accesibles a la transcripción.

Ambas familias de genes, muy conservados evolutivamente, codifican un conjunto de proteínas muy heterogéneas con diversos dominios de unión a DNA y de unión proteína-proteína que actúan formando complejos multiméricos. Los diferentes complejos interaccionan con el DNA en regiones denominadas Elementos de Respuesta a Polycomb (PREs) y Elementos de Respuesta a Trithorax (TREs) respectivamente. Se trata de secuencias de en torno a 100-300 pares de bases que pueden encontrarse tanto cerca como lejos del promotor. En loci complejos, como en los genes Hox, pueden encontrarse en gran número (Chiang et al., 1995; Horard et al., 2000; Mishra et al., 2001), y existen incluso regiones en los que PREs y TREs solapan, compartiendo las proteínas PcG y trxG sitios de unión al DNA (Orlando et al., 1998; Tillib et al., 1999; Bejarano and Milan, 2009).

El mecanismo más aceptado por el que los complejos PcG llevan a cabo el silenciamiento génico es mediante la compactación del DNA en una estructura altamente condensada e inaccesible a la maquinaria de transcripción llamada heterocromatina (Beisel and Paro, 2011). El DNA de las células se encuentra unido a unas proteínas llamadas Histonas, formando un complejo llamado cromatina. A modo general, la cromatina puede presentarse en 2 estados: la eucromatina, un estado laxo y accesible a la transcripción, que lo forman genes frecuentemente activos transcripcionalmente y la heterocromatina, un estado altamente empaquetado y por ello inaccesible a la maquinaria de transcripción (Fig. i4). Recientemente, estudios que abarcan el genoma entero han clasificado la heterocromatina en 3 categorías (Filion et al., 2010). Una de ellas, la denominada “BLUE”, corresponde a los genes silenciados por complejos PcG y se caracteriza por presentar la marca característica de la

histona H3K27 metilada además de por afectar específicamente a genes implicados en decisiones del desarrollo. Pese a que el mecanismo es de silenciamiento a largo plazo, el estado de esta cromatina es regulable y reversible a eucromatina, por lo que se la denomina heterocromatina facultativa.

Existen otros dos mecanismos por los que los complejos PcG pueden regular la transcripción (Francis and Kingston, 2001). Uno de ellos es mediante la interacción directa con la maquinaria de transcripción, lo que inhibiría su función. En último lugar también se ha demostrado que las proteínas PcG pueden movilizar las secuencias silenciadas a unas regiones específicas del núcleo, donde se localizan los PcG. Los 3 modelos están apoyados experimentalmente, y dado que no son mecanismos excluyentes, es probable que los 3 estén presentes en las células.

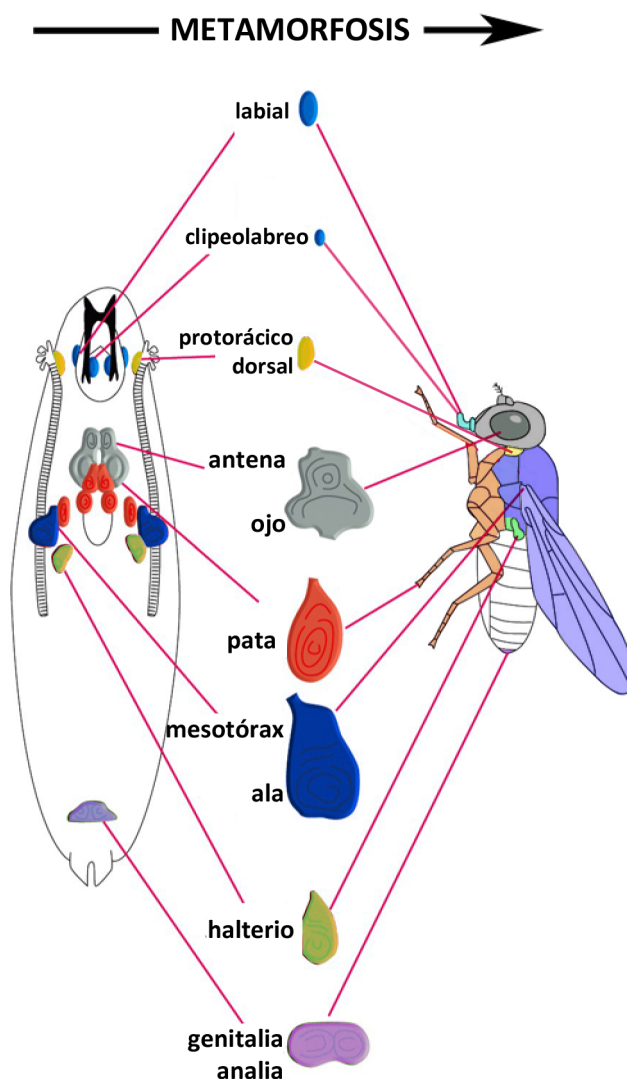


Figura I5. Los discos imaginales. Se muestran los discos imaginales en la larva y los tejidos que originan en el adulto (cedido por Javier Menéndez).

I5.. LOS DISCOS IMAGINALES

Los discos imaginales son estructuras en forma de saco, adheridas a la cara interna de la epidermis de la larva y que, tras la metamorfosis, forman el exoesqueleto del individuo adulto. *Drosophila* tiene 21 discos imaginales: dos series simétricas de 10 discos a cada lado del cuerpo que forman la cabeza y tórax con sus respectivos apéndices (alas, halterios, patas y otros apéndices cefálicos) y un último disco de simetría bilateral que construye la analia y la genitalia (Fig. I5). Se forman al final de la embriogénesis por invaginación del ectodermo. Crecen como un epitelio monocapa pseudoestratificado de fácil estudio al microscopio, y esta propiedad, unida a la facilidad de su extracción, los convierte en modelos muy convenientes para el análisis de la proliferación celular y la adquisición de patrón. Constan de

dos capas de epitelio enfrentadas por la cara apical y que dejan un lumen entre ambas: el epitelio columnar, que origina todas las estructuras adultas, y la membrana peripodial.

Probablemente, el disco mejor estudiado sea el del ala, que da lugar tanto al ala propiamente dicha como al mesotórax, que ocupa casi toda la región torácica. Este disco se origina en el lateral del embrión entre los parasegmentos 4 y 5 por acción de gradientes de Wg y Decapentaplegic (Dpp). Se genera como consecuencia de esta señalización una población de células que se invagina (Lawrence and Struhl, 1996; Morata, 2001) y que comprende células con identidad tanto de compartimento anterior como de compartimento posterior (Cohen et al., 1991). Este primordio de unas 50 células (Martin et al., 2009) inicia al final de primer estadio larvario (40 horas de desarrollo) un rápido programa de proliferación que consta de 9 divisiones que siguen una curva sigmoideal (las primeras divisiones apenas duran 5'5 horas, mientras que la última dura 24 horas). Al final del estadio 3, el disco prepupal alcanza un tamaño final de 30.000 células (Madhavan and A., 1977; Martin et al., 2009). Al final del desarrollo larvario, se encuentran establecidos además todos los elementos de patrón morfológico que se observan en la cutícula adulta (Bryant, 1975a).

Además de la separación entre los compartimentos anterior y posterior que hemos mencionado, en el disco imaginal de ala tienen lugar otras subdivisiones genéticas (Fig. i6A). Durante el segundo

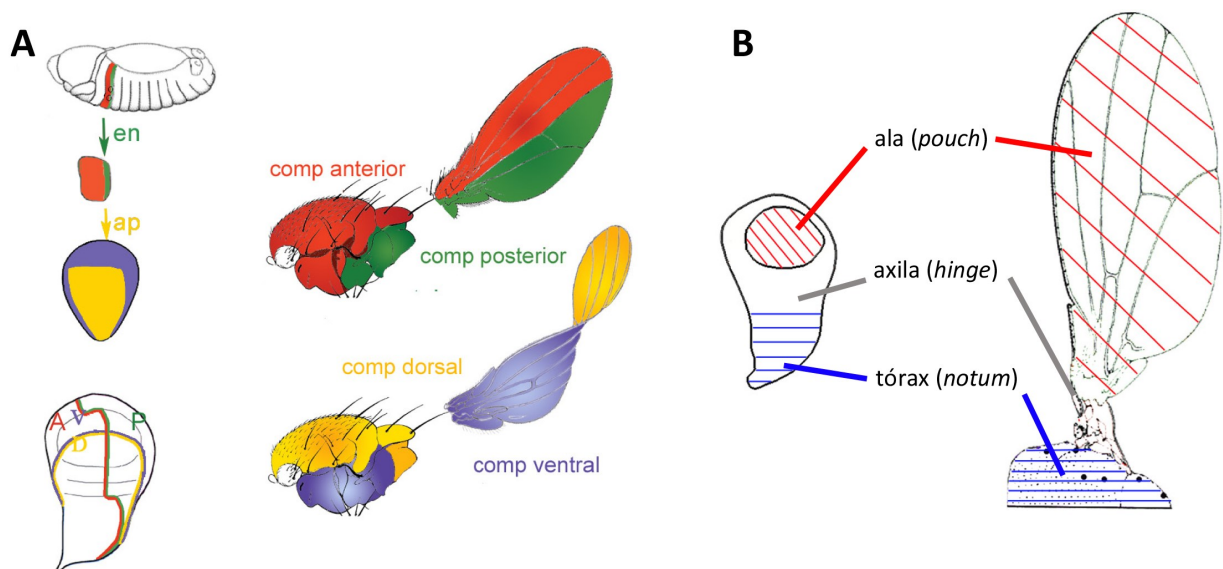


Figura i6. Subdivisiones genéticas en el disco imaginal de ala. (A) La división entre compartimentos anterior y posterior se produce por la expresión temprana de *en* en las células posteriores. La división entre compartimentos dorsal y ventral tiene lugar más tardíamente por la expresión de *ap* en territorio dorsal. Se muestran también las estructuras adultas formadas por cada compartimento. **(B)** Territorios presuntivos de ala, axila y tórax en el disco imaginal de ala y estructuras que forman en el adulto. Cedido por Silvia Aldaz.

estadio larvario, la expresión del gen *apterous* (*ap*) en un grupo de células, junto a la actividad de los ligandos de Notch Delta y Serrate, desencadena la segregación en dos nuevos compartimentos, dorsal (que adquiere *ap*) y ventral. Se forma así un nuevo borde de compartimentos, perpendicular al A/P (Garcia-Bellido et al., 1973; Garcia-Bellido et al., 1976; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993).

Aproximadamente a la vez que la segregación de compartimentos dorsal y ventral, tiene lugar una tercera subdivisión en el disco de ala, que diferencia entre la región presuntiva del tórax, el *notum*, y la región presuntiva del apéndice propiamente (Fig i6B). No obstante, no existe una restricción de linaje tan clara entre estas dos regiones como la que existe en los otros compartimentos (Díez del Corral et al., 1999; Zecca and Struhl, 2002b; Zecca and Struhl, 2002a). Se suele denominar *hinge* a la región que origina la axila del ala adulta, mientras que se denomina *pouch* a la región presuntiva de ala.

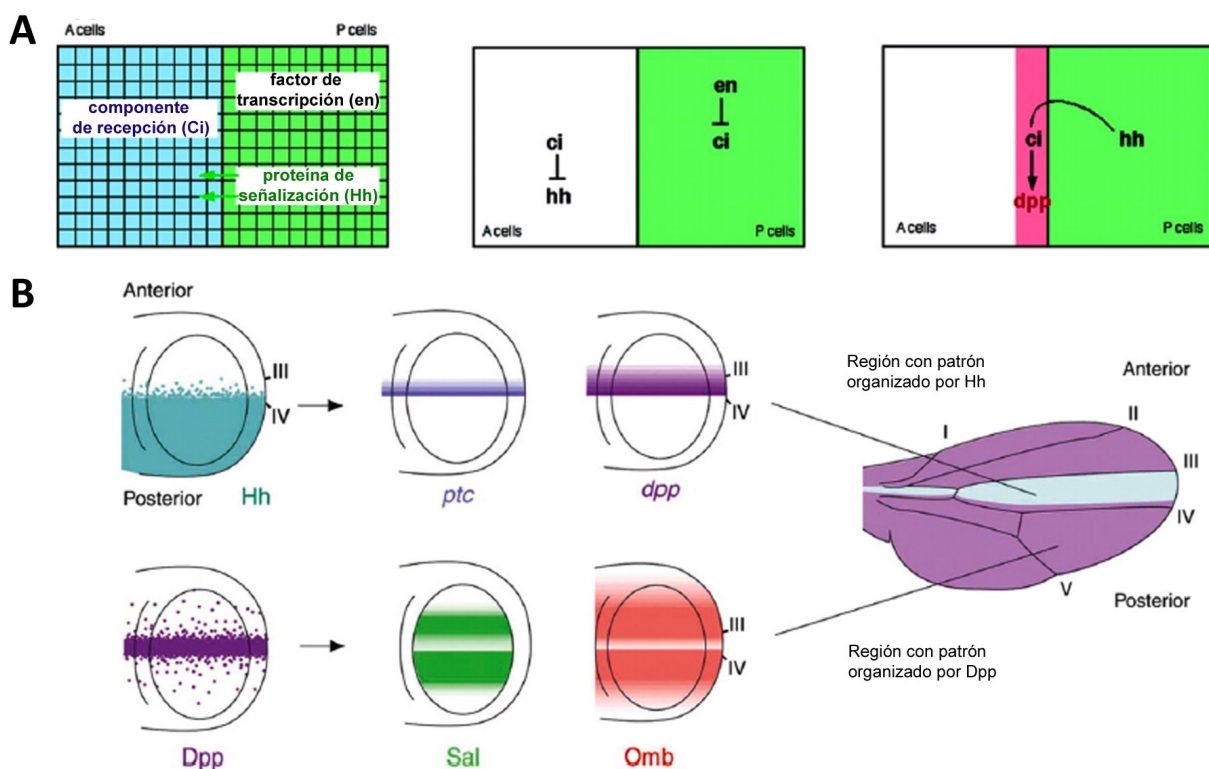


Figura 17. Activación y funcionamiento del organizador A/P. (A) *engrailed*, presente en el compartimento posterior, induce la expresión de *hedgehog*, que codifica un morfógeno difusible que activa genes exclusivamente en el compartimento anterior, como *cubitus interruptus* (*ci*) o *dpp*. En el compartimento anterior *ci* reprime la activación de *hh*, mientras que en el posterior, *en* reprime la de *ci*. (B) Hh y Dpp, por su capacidad de difundir, activan diferentes genes diana a lo largo del eje A/P dependiendo de su concentración. Dpp organiza el patrón de casi toda el ala adulta (como los genes *omb* y *sal*), a excepción de la región comprendida entre las venas 3 y 4, que depende de Hh (modificado de Tabata & Takei, 2004).

Una de las razones por las que es tan importante la compartimentación de tejidos en el desarrollo de los organismos es porque los bordes de compartimento actúan como centros organizadores. La confrontación de células con diferente determinación genética y afinidad lleva a la secreción de morfógenos que difunden y dirigen tanto la formación del patrón como el crecimiento del tejido. Un caso paradigmático es el del borde A/P. El morfógeno Hh es secretado por las células posteriores y difunde hacia el compartimento anterior, donde las células más cercanas al borde activarán la expresión de *decapentaplegic (dpp)*, otro morfógeno. Dpp, a su vez, establece un gradiente de concentración, de forma que cada célula en el disco, en función de su distancia al centro organizador, activará diferentes genes diana en forma de bandas paralelas al borde A/P (Fig. i7). Pero además de otorgar información posicional, Dpp también es responsable de la proliferación del tejido: tanto su pérdida de función como su expresión ectópica afectan la regulación del crecimiento (Burke and Basler, 1996; Martin-Castellanos and Edgar, 2002; Martin et al., 2004; Yagi et al., 2010).

LA APOTOSIS

Aunque resulte paradójico, la muerte celular programada es tan necesaria dentro de un programa de desarrollo como lo es la misma proliferación. En *Drosophila*, por ejemplo, los individuos mutantes en genes necesarios para esta muerte programada no sobreviven más allá de la embriogénesis (White et al., 1994) y en prácticamente todos los organismos su desregulación puede degenerar en enfermedades. Se denomina apoptosis a un tipo de muerte celular programada, en contraposición a otros tipos de muerte celular patológica, o necrosis (Wyllie et al., 1980). Cumple funciones en el desarrollo tan importantes como el esculpido de tejidos, la eliminación de estructuras innecesarias, el control del número de células cuando se generan en exceso o la eliminación de células dañadas o anormales, que pueden ser peligrosas para el organismo (Fuchs and Steller, 2011).

Experimentos en el nematodo *C. elegans* llevaron al descubrimiento de la base genética de la apoptosis (Ellis and Horvitz, 1986), y los estudios posteriores han podido constatar la alta conservación evolutiva de sus componentes. Toda la cascada de eventos lleva a la activación de unas proteasas llamadas caspasas, que una vez activadas proteolizan los componentes celulares, desembocando en la destrucción de la célula. Las caspasas que llevan a la degradación de todos los sustratos se llaman caspasas efectoras. Éstas se encuentran en forma de pro-enzimas inactivas de forma normal en la célula y para activarse deben ser, a su vez, proteolizadas por otras caspasas llamadas iniciadoras. En *Drosophila* al grupo de caspasas efectoras pertenecen las proteínas Drice, Decay y Dcp-1, mientras que las iniciadoras son Dronc y Dredd (Hay and Guo, 2006).

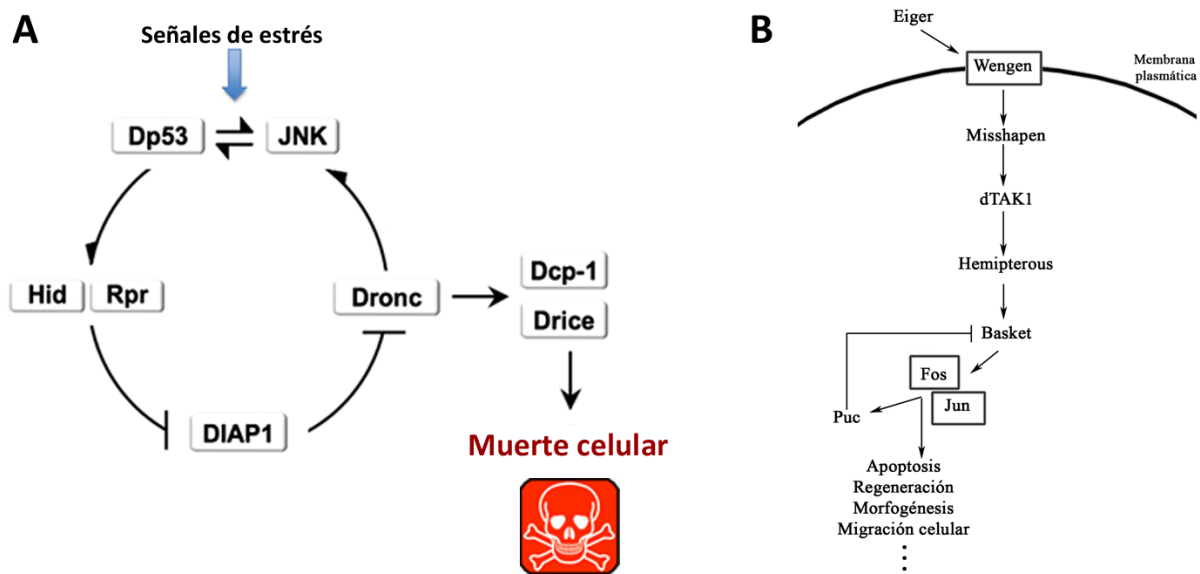


Figura I8. La apoptosis en *Drosophila* y la vía JNK. (A) Durante la apoptosis, las proteínas pro-apoptóticas como Hid y Rpr se unen e inactivan a la proteína anti-apoptótica Diap1. En ciertos contextos, como ante estrés, estos factores pro-apoptóticos pueden haber sido activados previamente por la ruta JNK y/o Dp53. Una vez inactivada Diap1, la caspasa iniciadora Dronc proteoliza a las caspasas efectoras, como Drice, que ejecutan la apoptosis degradando los componentes celulares. A su vez, Dronc puede activar de nuevo a la vía JNK y a Dp53, retroalimentando positivamente el proceso apoptótico (modificado de Shlevkov et al. 2012). (B) La ruta JNK puede ser activada por el estímulo del ligando Eiger, que se une específicamente al receptor Wengen, desencadenando una activación secuencial de quinasas. Como consecuencia, los factores de transcripción Fos y Jun provocan la activación de múltiples dianas y procesos. Una de estas dianas es el gen *puc*, regulador negativo de la vía (cedido por J. Menéndez).

Es sobre las caspasas iniciadoras sobre las que recae el proceso de regulación, orquestado por proteínas por un lado pro-apoptóticas y por otro anti-apoptóticas o IAPs (“Inhibitor of Apoptosis Proteins”). Las IAPs (en *Drosophila* Diap1 y Diap2) están encargadas de secuestrar a las caspasas iniciadoras, bloqueando su capacidad catalítica. Por su parte las proteínas pro-apoptóticas, en la mosca del vinagre Reaper (Rpr), Head involution defective (Hid), Grim, Sickie y Jafrac2, a través de la unión a estas IAPs y su ubiquitinación (que conduce a la degradación en el proteosoma de las IAPs) permiten la activación de las caspasas, y con ello la consecución de la apoptosis (Fig i8A).

Una de las vías de activación de la apoptosis más importantes en ciertos contextos es la de la c-Jun N-terminal Kinasa, o JNK, de la familia de las MAP-quinasas. Se trata de una vía de señalización pleiotrópica, implicada también en procesos tan diferentes como migración celular, proliferación, diferenciación, respuesta inflamatoria o regeneración (Kanda and Miura, 2004; Bosch et al., 2005; Igaki et al., 2006; Bergantinos et al., 2010a; Bergantinos et al., 2010b; Wu et al., 2010). Por un lado, se ha estudiado en *Drosophila* que la apoptosis activada por estrés (como tras la irradiación con rayos-X)

está mediada por la ruta JNK, que es capaz de activar a *rpr*, así como la apoptosis que es consecuencia de la competición celular (Moreno et al., 2002a; de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004). Por otro lado, un estudio reciente ha mostrado que Dronc activa un mecanismo de retroalimentación positiva mediada por JNK y p53 (Fig. i8A) que asegura que una vez la célula toma la decisión de iniciar el proceso apoptótico, este termina con la destrucción de la célula (Morata et al., 2011; Petersen and Stowers, 2011; Shlevkov and Morata, 2012).

La ruta consiste en la sucesiva activación de quinasas en cascada, que en *Drosophila* está formada principalmente por la JNK codificada por *basket*, una JNKK, *hemipterous* (*hep*), y varias JNKKK como *dTAK*. Existen varios receptores de membrana celular que ante el ligando extracelular correspondiente pueden iniciar la activación de la vía, como Wengen y su ligando Eiger. La fosforilación de los componentes de la ruta lleva a la activación de los factores de transcripción Fos y Jun. Uno de los genes diana de estos factores es *puckered* (*puc*) una fosfatasa que desfosforila la vía, actuando como regulador negativo (Fig i8B).

i7- LA REGENERACIÓN EN EL REINO ANIMAL

La idea de regenerar partes del cuerpo perdidas ha cautivado a la humanidad desde hace milenios. Hace 5000 años, los sumerios entendían el ciclo lunar como el poder del dios-luna Nanna (o Suen) de regenerar cada mes su cuerpo, un don que podía conceder a algunos mortales (Fig i9A) (Hall, 1985). Otros ejemplos de la mitología más conocidos son el del monstruo llamado Hidra, que podía regenerar sus múltiples cabezas (Fig. i9B), o el de Prometeo encadenado, condenado a ver regenerar su hígado repetidamente cada vez que lo devoraba un águila. A principios del siglo XVIII, los biólogos Abraham Trembley (1710-1784) (Fig i9C) y Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) describieron de modo independiente un minúsculo animal repleto de tentáculos con la asombrosa capacidad de reconstruir por completo su cabeza después de ser amputada. Ante tal capacidad y por su apariencia, Trembley bautizó al animal como hidra. En ese mismo siglo también se descubriría el fenómeno de regeneración en planarias y anfibios (Sanchez Alvarado, 2000). Pasarían dos siglos más para que se descubriera que la capacidad de Prometeo, después de todo, no era tan excepcional, pues el hígado humano también tiene capacidad de regeneración.

Dentro del término regeneración se engloban capacidades que van desde la cicatrización de una herida o la reparación de un epitelio que ha sufrido un daño hasta la reconstrucción completa de una extremidad amputada. El caso más extremo es el de las planarias, que pueden reconstruir todo el



Figura 19. Interés histórico en el fenómeno de la regeneración. (A) Relieve datado del 2100 a.C. que representa al rey Ur-Nammu bendecido por el dios-luna Nanna (representado por una media luna). Nanna fue la cabeza del panteón sumerio durante el periodo de hegemonía de la ciudad de Ur, y personifica el dios de la continuidad de la vida y la regeneración (Museo Británico). (B) Ánfora con una representación de Hércules combatiendo a la Hidra de Lerna, que podía regenerar sus cabezas al ser cortadas (Museo J. Paul Getty). (C) Grabado del zoólogo Abraham Trembley (1710-1784), su laboratorio y un dibujo de del animal que describió que, sorprendentemente, podía reconstruir su cabeza, al que llamaría hidra.

organismo a partir incluso de un fragmento que suponga $1/279$ de su cuerpo (apenas 10.000 células) (Reddien and Sanchez Alvarado, 2004; Sanchez Alvarado, 2004). A principios del siglo XX, Thomas Morgan estableció la distinción entre dos tipos de regeneración (Morgan, 1901): epimórfica, en la que el tejido se reemplaza mediante el crecimiento de otros tejidos, y morfoláctica, en la que los tejidos restantes se reorganizan para reconstruir la parte perdida, pero en ausencia de proliferación. Tradicionalmente se ha creído que en los organismos superiores la regeneración es esencialmente epimórfica, mientras que la morfalaxis se reserva a organismos inferiores como la hidra (Sanchez Alvarado, 2000). Sin embargo, recientemente se ha encontrado que en hidras tienen lugar ambos procesos, y el que ocurra uno u otro depende del punto de amputación (Chera et al., 2009; Galliot and Chera, 2010). Por su parte la morfalaxis también puede darse en organismos superiores como *Drosophila* (datos pendientes de publicar de Díaz-García, S. y Baonza, A.). Probablemente los términos epimorfosis y morfalaxis hagan referencia a dos situaciones extremas, entre las cuales se abarque un abanico de diversas modalidades de regeneración. Quizá por ello contraponer los 2 mecanismos sea un esfuerzo baldío (Agata et al., 2007; Galliot and Ghila, 2010).

Otra diferencia importante que se encuentra entre organismos (o incluso entre tejidos de un mismo organismo) se refiere al tipo de células que llevan a cabo la reconstrucción. En algunos sistemas las encargadas son células madre alojadas en el mismo tejido, como en el intestino de *Drosophila* (Jiang and Edgar, 2011). Otros organismos, como las planarias, poseen una población de células super-especializadas, llamadas neoblastos, que son reclutadas en la herida (Reddien and Sanchez Alvarado, 2004; Sanchez Alvarado, 2004; Baguna, 2012). En otros casos son células del entorno de la herida, que son capaces de cambiar su estado de diferenciación, en un proceso llamado trans-diferenciación. El mejor ejemplo de esta capacidad de adquisición de pluripotencia se encuentra en salamandras como el ajolote (Echeverri and Tanaka, 2002; Morrison et al., 2006), si bien experimentos recientes han mostrado que en la regeneración de su patas, con excepción de la dermis que sí puede reconstruir cartílago, no existe trans-diferenciación (Kragl et al., 2009). Por ello, sigue siendo una cuestión por resolver hasta qué punto las células diferenciadas pueden desdiferenciarse y reanudar el programa de desarrollo del organismo en un punto anterior.

Una característica que sí parece común a todos los sistemas conocidos es la formación del blastema (Sanchez Alvarado, 2000): una agrupación local de células sujeta a señalizaciones específicas y que, bien por proliferación y/o bien por re-diferenciación, cierran la herida y reconstruyen la estructura perdida (Slack, 2003). También parece común la subdivisión temporal en 3 fases: cierre de la herida, formación del blastema y re-diferenciación, si bien los procesos concretos que ocurren en cada modelo son diferentes (Galliot et al., 2008) (Fig. i10).

Mientras que otros campos de la biología del desarrollo, como la diferenciación de tejidos o el control del crecimiento, se beneficiaron muy rápidamente del desarrollo de la genética y la biología

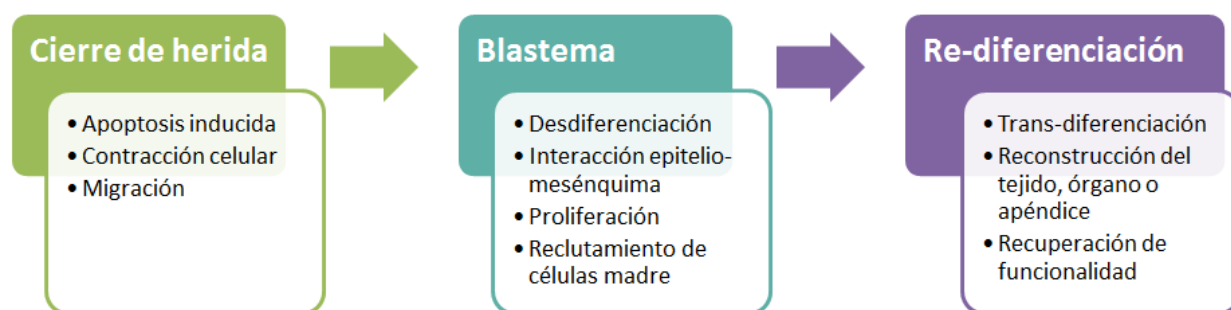


Figura i10. Fases principales de la regeneración en vertebrados e invertebrados. El esquema muestra las 3 fases del proceso de regeneración tanto en vertebrados como en invertebrados, así como los mecanismos concretos que son variables en función del modelo estudiado (basado en Galliot et al., 2008).

molecular en los años 80, el estudio de la regeneración ha necesitado más tiempo para experimentar el mismo grado de progreso (Slack, 2003). A esto ha podido contribuir el que los organismos modelo de regeneración no forman parte de los modelos favoritos de experimentación genética. Por ello, el estudio de este proceso en *D. melanogaster* puede arrojar nuevas posibilidades.

II. LA REGENERACIÓN EN *D. MELANOGASTER*

El descubrimiento de la capacidad de regenerar de los discos imaginales fue realizado por Ernst Hadorn y sus colaboradores entre las décadas de 1940 y 1970. Su interés entonces era conocer qué grado de determinación poseían los discos imaginales, y para ello llevó a cabo experimentos en los que introducía diversos fragmentos dentro de larvas maduras, observando después que estructuras originaban en la larva anfitriona cuando ésta completaba su metamorfosis (Worley et al., 2012). Esto le permitió establecer mapas de destino celular muy detallados, y concluir que existía un alto grado de determinación en los discos maduros (Hadorn and Buck, 1962; Schubiger, 1971; Bryant, 1975a). La sorpresa vino al implantar estos fragmentos dentro de larvas más jóvenes o en abdómenes de hembras adultas (donde el disco no diferencia), pues encontraron que estos fragmentos eran capaces de generar nuevo tejido. Un análisis sistemático del fenómeno les hizo concluir que al fragmentar en dos partes un disco, el fragmento mayor reconstruía la parte perdida, mientras que el menor se duplicaba especularmente (Bryant, 1971; Schubiger, 1971; Bryant, 1975b) (Fig. i11).

De estos experimentos clásicos de fragmentación surgió un segundo descubrimiento. Hadorn y sus colaboradores estaban interesados en conocer el grado de estabilidad de la determinación celular. Llevaron a cabo implantes de discos genitales que eran diseccionados por la mitad, implantados en una larva y, una vez reconstruidos, vueltos a diseccionar de forma sucesiva. Con este sistema llegaron a mantener cultivos de discos durante 12 años, (mostrando, además, la práctica inmortalidad de las células de discos imaginales). En paralelo, la otra mitad del disco podía ser implantada en una larva madura para determinar qué estructura originaba en el adulto, y por tanto si las células mantenían su identidad de disco genital. De forma inesperada, se encontró que tras 10-20 rondas de cultivo, una parte de los fragmentos originaban tejido de ojo-antena y pata. Hadorn denominó a este fenómeno transdeterminación (Hadorn, 1965). Todos los discos imaginales tienen esta capacidad, si bien existen unos cambios más frecuentes que otros: por ejemplo la transdeterminación de pata a ala es muy frecuente, mientras que de pata a disco genital es inexistente (Hadorn, 1965; Hadorn, 1968).

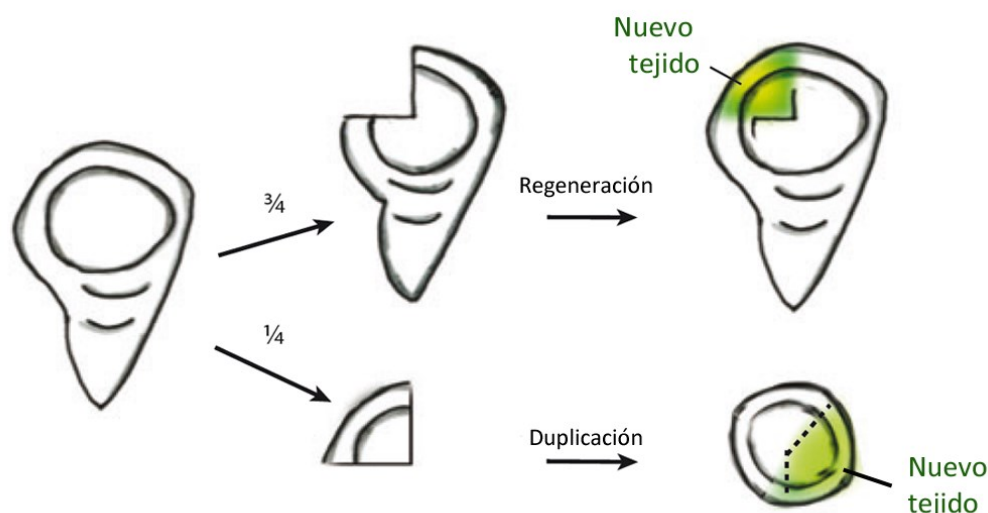


Figura I11. Reconstrucción de fragmentos de discos de ala. Al cortar discos de ala, el fragmento mayor regenera, mientras que el menor hace una duplicación espejular (tomado de Worley et al., 2012).

Abordajes más recientes han encontrado que estas transdeterminaciones pueden ser inducidas: por ejemplo la sobreexpresión de *wingless* en el disco de pata lleva a la rápida transdeterminación a ala en las células bajo altos niveles de señalización por Dpp (Johnston and Schubiger, 1996; Maves and Schubiger, 1998). Estos modelos han permitido encontrar multitud de genes implicados en regeneración y plasticidad celular (McClure and Schubiger, 2008; McClure et al., 2008). Asimismo, han ilustrado sobre el mecanismo que permite a las células tal cambio de identidad celular: la inhibición de genes del grupo PcG mediada por activación de la ruta JNK (Lee et al., 2005).

Una segunda aproximación que ha despertado el interés en los discos imaginales como modelo de regeneración es la llamada proliferación compensatoria. Fue descubierta al observar que se podían recuperar estructuras adultas de tamaño y función normales aun eliminando al 40-60% de las células de los discos mediante irradiación con rayos-X (Haynie and Bryant, 1977). La recuperación tiene lugar tanto por un incremento en el ritmo de división como por una dilatación del periodo proliferativo (Wells and Johnston, 2012). Esta proliferación difiere de la encontrada en blastemas, por cuanto en este fenómeno es difusa. No obstante, se asume que las bases moleculares deben ser semejantes (Worley et al., 2012). Mas aún: tras amputaciones de hidras se ha encontrado inducción de apoptosis en las células cercanas a la herida, que promueven la proliferación del blastema mediante señalización de Wnt (homólogo de *wingless*) (Chera et al., 2009). Este descubrimiento pone de relieve la conexión de la proliferación compensatoria con la regeneración.

Para facilitar el estudio de la señalización implicada en la proliferación compensatoria se puede emplear la proteína de baculovirus p35, que bloquea la caspasa efectora Drice. Al mantener estas

células el programa apoptótico en funcionamiento pero ser incapaces de ejecutar su destrucción, puede analizarse la señalización que inducen las células apoptóticas. Así, puede encontrarse que estas células, denominadas “no muertas”, son capaces de inducir tumores de forma no autónoma mediante señalización de Wg y Dpp (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004). No obstante, un trabajo reciente ha demostrado que en una situación normal de apoptosis por rayos-X esta señalización es irrelevante, pues el disco recupera su tamaño incluso en ausencia de estos factores (Perez-Garijo et al., 2009). La proliferación compensatoria parece ser una propiedad homeostática de los compartimentos, que son capaces de regular su propio tamaño, independientemente de las señales proliferativas Dpp y Wg (datos sin publicar de Mollereau et al.).

En cambio, en los últimos años la ruta JNK sí está cobrando un papel central en la regeneración de discos imaginales (Bergantinos et al., 2010b; Worley et al., 2012). Se ha comprobado que es un marcador clave del blastema que aparece al cortar discos, permitiendo el cierre de la herida y la proliferación (Bosch et al., 2005; Bosch et al., 2008). De hecho, mediante microarrays y estudios bioinformáticos se ha comprobado que es el elemento central de toda la cascada genética de respuesta que tiene lugar en el disco (Blanco et al., 2010). En experimentos de ablación genética mediada por sobreexpresión de *rpr* se han validado estos papeles en proliferación y cierre de herida (Bergantinos et al., 2010a). A estas evidencias hay que añadir la modulación epigenética durante transdeterminación que ya mencionamos. Con todo lo mostrado, esta ruta parece participar en las 3 etapas que como mencionamos, son la base del proceso regenerativo (Fig. i10).

La aplicación de nuevas herramientas genéticas a la ablación de discos imaginales ha arrojado muy recientemente nuevos descubrimientos y modelos de estudio (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a; Sun and Irvine, 2011). El empleo de ablaciones genéticas permite ensayar la respuesta proliferativa ante la eliminación de células de dominios muy definidos. Aporta además facilidad experimental y reproducibilidad, lo que permitirá realizar nuevos *screenings* de moduladores de la regeneración en el futuro.

Esta tesis doctoral se encuadra dentro de este abordaje de ablación genética. Mediante la inducción masiva de apoptosis en dominios concretos, pretendemos analizar la respuesta del disco imaginal en cuanto a reparación del epitelio y a proliferación. Asimismo, queremos aprovechar este sistema para determinar si las células imaginales pueden adquirir pluripotencia que les permita reconstruir otros dominios, en los que de otra forma durante el desarrollo no participarían.

o. objetivos

El objetivo central de esta tesis ha sido estudiar la respuesta del disco imaginal de ala ante la ablación genética de diferentes dominios. Por un lado hemos inducido muerte en dominios de linaje abierto para determinar las características generales de esta respuesta. Por otro hemos estudiado si existen en este sistema de regeneración fenómenos de transdiferenciación o adquisición de pluripotencia, para lo que hemos utilizado los bordes de compartimento como modelo. Hemos abordado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la capacidad y velocidad de reparación del disco ante la eliminación de dominios de gran tamaño, que ocupan una parte considerable del disco, y qué origen tienen las células que llevan a cabo esta reconstrucción.
- Analizar la respuesta proliferativa desencadenada, prestando especial atención a si esta reacción es local, como la de un blastema clásico, o sistémica.
- Determinar si, ante la inducción de muerte masiva en un compartimento, el otro compartimento puede contribuir con células a su reconstrucción, y qué mecanismos genéticos podrían permitir este cambio de identidad.

m. materiales y métodos

m1. LÍNEAS DE *D. melanogaster* EMPLEADAS

m1.1. Sistemas binarios de expresión

Este conjunto de técnicas permite expresar productos génicos bajo el control de enhancers/promotores tanto ectópicos como endógenos mediante un sistema de 2 componentes: un elemento denominado trans-activador (TA) dirigido por promotores y enhancers, de los cuales copia su patrón de expresión espacio-temporal, y un segundo elemento que consiste en el gen efector que se pretende expresar bajo el control de secuencias activadoras (SA, consistentes en sitios de unión del TA) que dirigen su expresión. Adicionalmente, se puede añadir un tercer elemento, un represor de la activación transcripcional, cuya actividad puede controlarse por cambios de temperatura o presencia de determinadas moléculas, aportando al sistema un control temporal de la expresión del gen efector (Figura m1A).

El sistema más tradicionalmente empleado en *Drosophila* es el Gal4/UAS/Gal80 (Brand and Perrimon, 1993) procedente de levaduras, en el que el TA es la proteína Gal4, que reconoce las secuencias UAS y cuyo represor es el Gal80. Un refinamiento posterior de la técnica consiste en emplear una versión termosensible del represor bajo el control del promotor ubicuo (*tub*-Gal80^{TS})

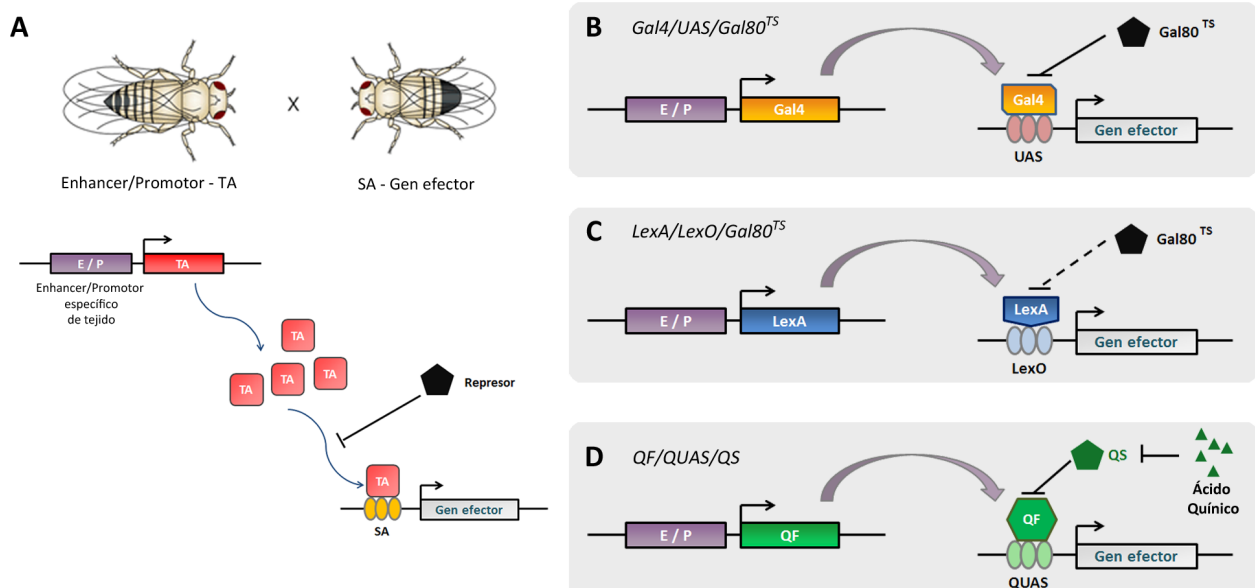


Figura M1. Sistemas binarios de expresión génica. (A) Esquema de la lógica general de todos los sistemas binarios, en los que se utilizan 2 elementos: un trans-activador (TA) bajo el control de *enhancers* y/o promotores, que aportan un control espacio-temporal, y por otro lado el gen efector que se desea sobreexpresar bajo el control de secuencias activadoras (SA) a las que se une el TA. Al mantener ambos elementos separados en líneas de *Drosophila* distintas se previenen efectos deletéreos, y sólo al efectuar un cruce tiene lugar la sobreexpresión. Los sistemas pueden refinarse añadiendo un elemento represor cuya actividad puede modularse por el experimentador, añadiendo un nivel adicional de control temporal. (B-D) Esquemas de los sistemas Gal4/UAS/Gal80^{TS} (B), LexA/LexO/Gal80^{TS} (C) y QF/QUAS/QS (D) con los nombres que reciben los distintos elementos de cada sistema. Nótese que en los 2 primeros el represor es la proteína Gal80^{TS}, cuya actividad puede ser modulada por temperatura (aunque no todas las versiones de LexA son reprimibles), mientras que en el tercero es la proteína QS, modulable añadiendo ácido quínico a la alimentación.

(McGuire et al., 2003) que ejerce una eficiente represión a la temperatura restrictiva de 17°C y queda inactivado a la temperatura permisiva de 29°C (Figura m1B).

Recientemente se han desarrollado 2 sistemas de expresión alternativos. En el LexA/LexO/Gal80 (Figura m1C) (Yagi et al., 2010) existen diferentes TAs (unos reprimibles por Gal80, otros no) que activan genes que se encuentren a continuación de secuencias LexO. En este trabajo el TA empleado es el LHG, que sí presenta represibilidad por Gal80. Por su parte, en el QF/QUAS/QS (Figura m1D) (Potter et al., 2010), procedente del hongo *Neurospora crassa*, la proteína QF ejerce de TA, las secuencias activadoras son llamadas QUAS y el represor es el QS, cuya actividad puede ser a su vez reprimida en presencia de ácido quínico.

m1. Líneas Gal4, LHG y QF

GH146-QF, ET40-QF (referida en este trabajo como *p*sc-QF, por estar insertada en el gen *posterior sex combs*) (Potter et al., 2010), *hh*-Gal4 (Tanimoto et al., 2000), *ap*-Gal4 (Calleja et al., 1996),

act-gal4 (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC), *rn-Gal4* (St Pierre et al., 2002) y *sal*^{EPV}-Gal4 (en adelante *sal-Gal4*) (Cruz et al., 2009). Los patrones de expresión de estas líneas se muestran en la Figura m2.

m1C. Líneas UAS, LexO y QUAS

UAS-GFP, UAS-LacZ, UAS-Flp, UAS-*hid*7 (en adelante, UAS-*hid*), UAS-*dp53.EX* (en adelante UAS-*p53*), UAS-*hep*^{CA} y UAS-*rpr* proceden del BSDC. UAS-*diap1-IR* ("Inverted Repeats", repeticiones invertidas, funcionalmente equivalentes a un RNAi, y por ello en adelante referido como *diap1-RNAi*) (Leulier et al., 2006), UAS-*eiger* (Moreno et al., 2002b), UAS-*en* (Guillen et al., 1995), UAS-*Ubx* (Castelli-Gair et al., 1994), QUAS-Flp, QUAS-mCD8-GFP, QUAS-mtdTomato (Potter et al., 2010).

m1D. Otras líneas empleadas

Para seguir la expresión de diferentes genes, hemos empleado las siguientes inserciones de marcadores, que reproducen sus patrones espacio-temporal: *puc-LacZ* (Martin-Blanco et al., 1998), *mew-YFP* (Kyoto Stock Center CPTI-001678) y *en-LacZ* (Hama et al., 1990).

Asimismo para la realización de los experimentos de regulación epigenética, empleamos las estirpes mutantes *Pc*³ (Lewis, 1978) y *trx*^{E2} (Kennison and Tamkun, 1988).

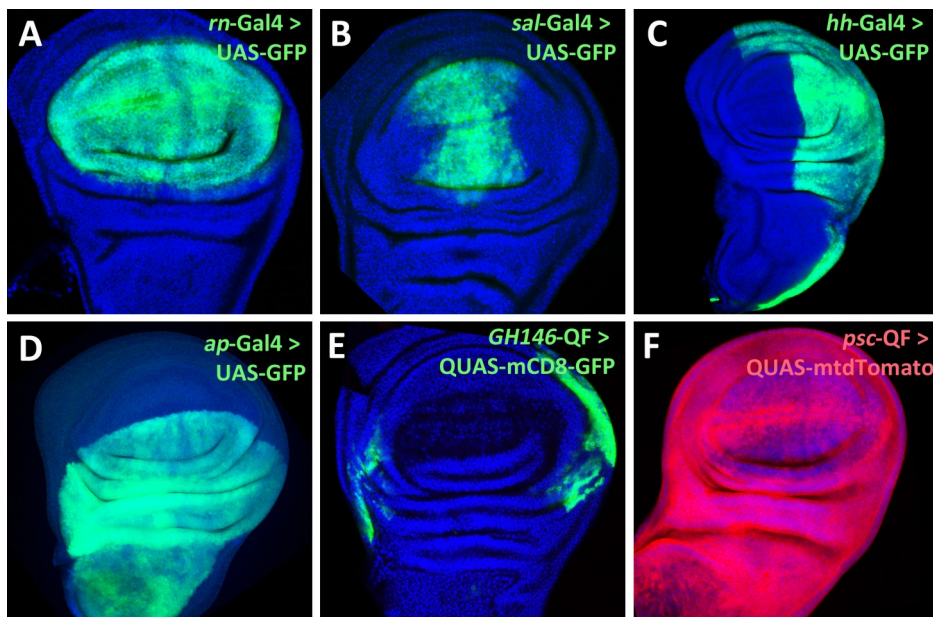


Figura M2. Patrones de expresión en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario de las líneas Gal4, QF y LexA utilizadas en este trabajo. (A) *rn-Gal4* abarca todo el *pouch* del ala y parte del *hinge*. (B) *sal-Gal4* comprende sólo la región medial del *pouch*. (C) *hh-Gal4* abarca todo el compartimento posterior, y se expresa exclusivamente en éste. (D) *ap-Gal4* comprende el compartimento dorsal, expresándose sólo en éste. (E) *GH146-QF* comprende 2 regiones del *hinge*, en su parte más proximal. (F) *psc-QF* tiene un patrón ubicuo.

m12. Construcción de la línea QUAS-puc

A partir de la línea UAS-*puc*^{2A} (Martin-Blanco et al., 1998) se amplificaron por PCR el “polilinker” del pUAST y el cDNA de gen *puckered* con los oligonucleótidos:

UAST-F: CACACCACAGAAAGTAAGGTTCTTCAC

UAST-R: GAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAG

El producto de la PCR (de 3 kilobases) se introdujo en un vector pGEM-T (Promega). El vector resultante se digirió con las enzimas de restricción BglII y NotI y se introdujo en el vector pQUAST (Potter et al., 2010) que aporta las secuencias QUAS a la construcción. Finalmente, con una digestión de BamHI se introdujo el fragmento QUAS-*puc* dentro del vector pCa4B2G (Markstein et al., 2008) que flanquea la inserción con los elementos silenciadores “*gypsy*” (que aumentan la expresión del transgén y reducen efectos posicionales del punto de inserción). Este vector incluye un gen marcador *w⁺* y una región attB para inserción dirigida en el genoma mediante la integrasa del bacteriófago ϕ C31 (Groth et al., 2004). El vector resultante se microinyectó en embriones con la región complementaria de homología attP en la región 51D del cromosoma 2R. Los transformantes fueron escrutados por color de ojos y balanceados.

m2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS CLONAL

m21. Clones de recombinación mitótica (“*en trans*”)

Estos clones de células se generaron mediante el sistema Flipasa/FRT, procedente de levaduras (Xu and Rubin, 1993). Para esta técnica se disponen secuencias FRT (“Flipase Recombination Target”) en la misma posición de cromosomas homólogos, que recombinan entre sí gracias a la recombinasa conocida como Flipasa. De esta forma se producen células homocigóticas para el brazo cromosómico donde se encuentra el FRT. Hemos empleado la construcción *hs-Flp112* (Struhl and Basler, 1993) con la que la expresión de la Flipasa se controla por un promotor dependiente de temperatura. Así, los clones se generan en el momento que se escoge administrando un golpe de calor de 37°C. En esta tesis hemos generado clones homocigóticos para el marcador GFP y clones gemelos homocigóticos para el marcador LacZ en el mismo evento de recombinación (Fig. m3A). Las líneas que hemos empleado son *ubi-GFP FRT80B* y *arm-LacZ FRT80B* (BDSC).

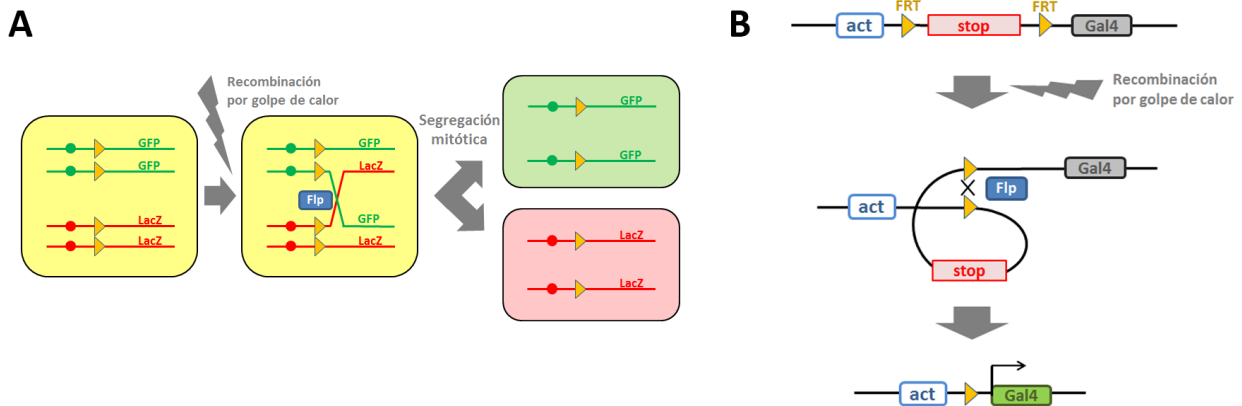


Figura M3. Técnicas de análisis clonal empleadas. (A) Clones de recombinación mitótica. La recombinación mediada por la Flp sobre secuencias FRT “en trans” permite el intercambio de cromátidas hermanas. Así, en la segregación de cromosomas durante la división celular, en el ejemplo mostrado puede suceder que una célula hija herede 2 copias del marcador *ubi*-GFP y ninguna del otro marcador *arm*-LacZ. Recíprocamente, la otra célula hija heredaría 2 copias del *arm*-LacZ mientras que se volvería nula para el *ubi*-GFP. **(B)** Clones de recombinación por escisión de secuencia. En este caso la Flp actúa sobre secuencias FRT “en cis” que llevan a la escisión de la secuencia de DNA comprendida entre ambas. En el caso mostrado, la escisión de una secuencia de parada de la transcripción acerca el promotor ubicuo *act* a la secuencia del Gal4, induciendo una expresión constitutiva de Gal4 en la célula en la que ha tenido lugar la recombinación.

m3B. Clones por escisión de secuencia (“en cis”)

Si las secuencias FRT se posicionan “en cis” dentro de un mismo cromosoma, al producirse la recombinación tiene lugar la escisión de la secuencia comprendida entre ambos FRT. Esta técnica, conocida como “Flp-out” (Struhl and Basler, 1993) pone en contacto las secuencias adyacentes a los FRT, y así, si se dispone de un promotor a un lado del *cassette* escindible y un transgén al otro, solo se activará este último en aquellas células donde tenga lugar la recombinación (Fig. m3B). Hemos empleado esta técnica para generar clones que adquieren la expresión de Gal4 de forma ubicua y heredable mediante el *cassette* *act*>CD2 *y*⁺>Gal4 (en adelante *act*>stop>Gal4) (Ito et al., 1997). De forma análoga, también hemos generado clones de ganancia del marcador neutro GFP mediante la construcción *ubiP63E*>stop>EGFP (Evans et al., 2009).

m3C. Marcaje de linaje celular

Una variación de la técnica anterior permite el seguimiento del linaje celular de una línea Gal4 o QF. Para ello, mediante una construcción UAS-Flp o QUAS-Flp se consigue recombinar un *cassette* no de forma clonal, sino en todas las células en el dominio de expresión de dichas líneas. Al ser la recombinación irreversible, las células quedan marcadas de forma indeleble y heredable para el marcador del *cassette* (Struhl and Basler, 1993; Weigmann and Cohen, 1999; Evans et al., 2009).

Durante el desarrollo, muchos genes presentan patrones de expresión variables en el espacio y en el tiempo. Una vez recombinado el *cassette*, al no depender la marca de la expresión del transactivador, sino de un promotor ubicuo y constitutivo, esta estrategia es útil para detectar células que ya no forman parte del dominio en cuestión, pero si lo hicieron en una etapa anterior. En este trabajo hemos empleado con este fin las construcciones *ubiP63E>stop>GFP* (un obsequio de C. Evans y U. Banerjee) y *act5C>stop>LacZ* (Struhl and Basler, 1993).

ma 4. Puerta lógica "A NOT HS"

El empleo de dos sistemas de expresión independientes permite la sobreexpresión de genes en patrones más complejos que los que permite un solo sistema, gracias a las llamadas puertas lógicas (Potter et al., 2010; Yagi et al., 2010). Estos diseños experimentales permiten sumar patrones de expresión de 2 líneas (puertas A OR B), conseguir expresión solo en la región de solape de 2 líneas (A AND B) o restar del patrón de una línea la zona en la que solapa con la segunda línea (A NOT B), entre otras posibilidades. Estas últimas, las puertas lógicas A NOT B se construyen poniendo el represor del sistema A bajo el control de la línea B. Reciente se ha desarrollado este abordaje creando una colección de líneas del tipo B-Flp que inducen la recombinación de un *cassette tubP>stop>Gal80* (Bohm et al., 2010).

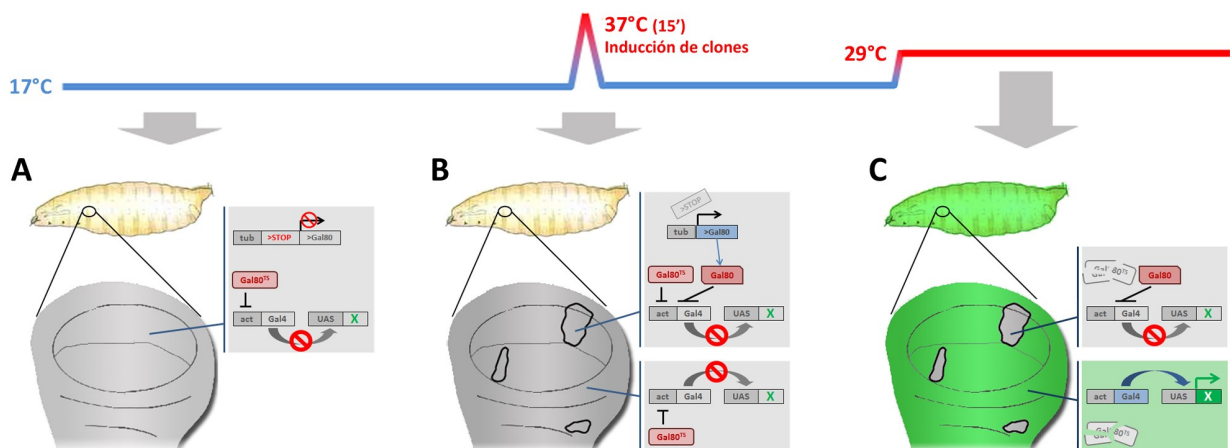


Figura M4. Puerta lógica "A NOT HS". (A) En el diseño experimental mostrado, al mantener las larvas a 17°C el represor Gal80^{TS} bloquea la actividad de la proteína Gal4, y por tanto la expresión de cualquier secuencia UAS (por simplicidad del esquema, no se muestra que esta represión es al nivel de la proteína Gal4). (B) Mediante su activación por un golpe de calor, la Flp hace recombinar en algunas células (parte de arriba) un *cassette tub>stop>Gal80*, lo que genera clones que poseen una segunda fuente de Gal80, que en este caso no es termo-sensible. (C) Llevando las larvas a 29°C el represor Gal80^{TS} se inactiva, llevando a la expresión de las secuencias UAS en todo el organismo (parte de abajo), a excepción de los clones que se generaron previamente, por contar estos con un Gal80 termo-estable (arriba). Se crea así una situación de clones de células silvestres, refractarias para el Gal4, rodeadas de tejido que sobreexpresa un determinado gen.

En esta tesis hemos adaptado esta estrategia, haciendo recombinar este último *cassette* de forma clonal por un golpe de calor mediante *hs-Flp*. Por ello, hemos llamado a esta puerta lógica “A NOT HS”. Con este diseño experimental podemos inducir, dentro de un dominio de sobreexpresión Gal4/UAS/Gal80^{TS}, clones de células refractarias para el Gal4, y que por tanto tienen un fenotipo silvestre (Fig. m4).

PROTOCOLO DE ABLACIÓN GENÉTICA

Hemos utilizado el sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS} para dirigir la sobreexpresión de factores inductores de apoptosis. Al ser un sistema dependiente de temperatura, podemos controlar no sólo la región en la que inducimos la ablación (mediante el Gal4), sino también el momento del desarrollo en el que administramos el pro-apoptótico. Como protocolo estándar, hemos realizado puestas de embriones de 24 horas, mantenidas 7 días a la temperatura restrictiva de 17°C. Tras este periodo transferimos las larvas a la temperatura permisiva de 29°C, administrando previamente un golpe de calor de 30 minutos a 37°C (excepto en los experimentos de inducción de clones) para acelerar la inactivación del Gal80^{TS}. Este momento de inducción de la ablación corresponde aproximadamente al paso entre segundo y tercer estadio larvario. Tras un periodo de ablación variable, en los experimentos que se indique se devolvieron las larvas a 17°C para volver a activar el Gal80^{TS} y permitir así un periodo de recuperación.

En nuestros experimentos hemos añadido, además, la capacidad de seguir el linaje del dominio dañado, para lo que hemos añadido un UAS-Flp y un *cassette act>stop>LacZ*. Con ello, de forma simultánea a la inducción de apoptosis quedan marcadas todas las células del dominio con una marca LacZ independiente de Gal4. Por ello, al devolver las larvas a 17°C las células supervivientes mantienen la marca, mientras que cualquier célula que acceda al dominio no la adquirirá *de novo*, por la actividad del Gal80^{TS} (Fig. m5).

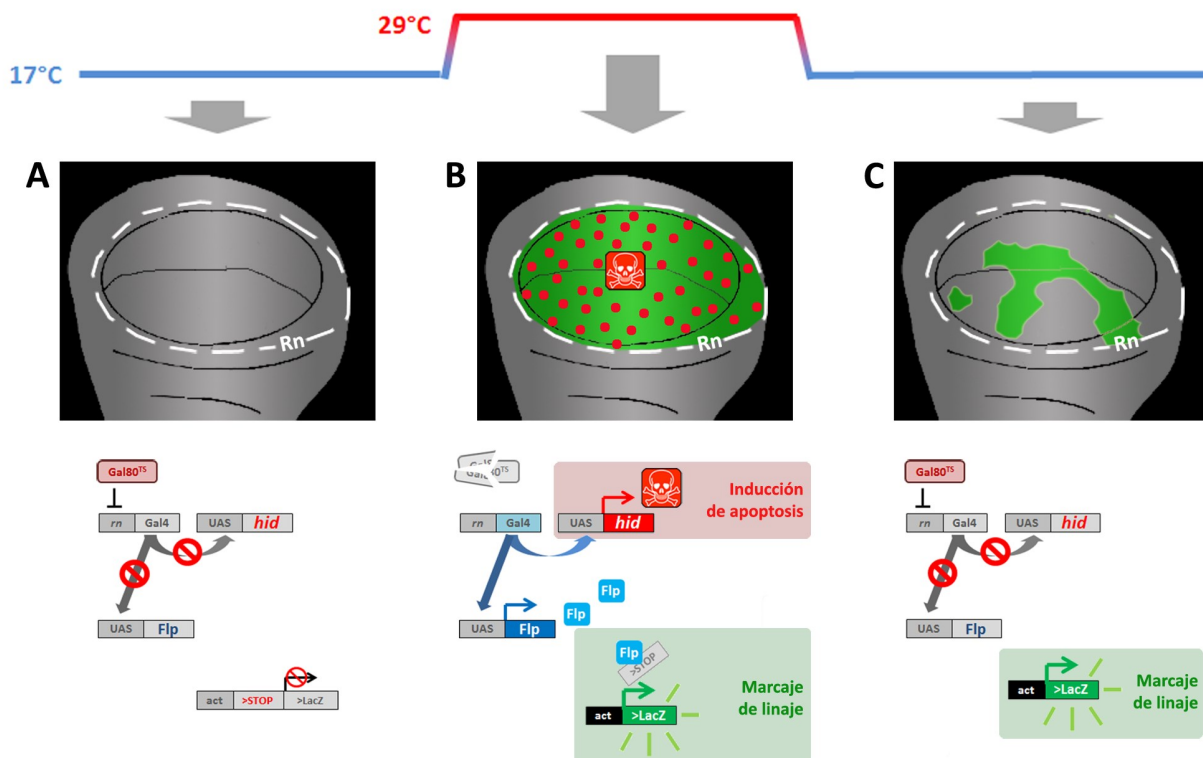


Figura M5. Sistema de ablación genética. (A) En larvas mantenidas a 17°C el represor $Gal80^{TS}$ bloquea la actividad de la proteína $Gal4$, y por tanto la expresión de cualquier secuencia UAS (por simplicidad del esquema, no se muestra que esta represión es al nivel de la proteína $Gal4$). (B) Llevando las larvas a 29°C el represor $Gal80^{TS}$ se inactiva, lo que desencadena 2 efectos: i) se induce la sobre-expresión de un gen pro-apoptótico (en el ejemplo hid) que lleva a cabo la ablación del dominio (puntos rojos en el dibujo); ii) la expresión de la Flp lleva a recombinar un *cassette* que otorga una marca indeleble a todas las células de este dominio (territorio verde en el dibujo). (C) Tras devolver las larvas a 17°C se recupera la actividad del $Gal80^{TS}$, cesando la de hid y Flp . Ello permite la recuperación del dominio dañado. Al ser la marca de linaje independiente de $Gal4$, las células que formaban parte del dominio durante la ablación seguirán marcadas, mientras que cualquier célula que acceda *de novo* al dominio no presentará esta marca. Este diseño, por tanto, permite conocer el origen de las células que llevan a cabo la reconstrucción.

M4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

Las larvas se diseccionaron en PBS en hielo por un tiempo máximo de 20 minutos. La fijación se realiza durante 45' en una solución de paraformaldehído al 4% con los detergentes DOC y Tritón X-100 al 0'1%. Siguen 3 lavados de 15' con solución de lavado (PBS + Tritón X-100 0'03% + BSA [albúmina de suero bovino]). Se incuba con el anticuerpo primario en PBT durante toda la noche a 4°C. Se retira el anticuerpo y se lava 4 x 15' con solución de lavado. Sigue la incubación de anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente y, de nuevo, 4 lavados de 15' con solución de lavado. Los discos fueron montados en medio Vectashield (Vector, Inc.).

Se emplearon los siguientes anticuerpos para la detección de proteínas en discos imaginales:

- Anti-Caspasa 3 activada: Roche, desarrollado en conejo. Usado 1:50
- Anti- β -Galactosidasa: Promega, desarrollado en ratón. Usado 1:50
- Anti-Spalt: cedido por J.F. de Celis, desarrollado en rata. Usado 1:50
- Anti-Crumbs: Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) (Cq4), desarrollado en ratón. Usado 1:25
- Anti-Histona3 fosforilada (PH3): Cell Signalling Technology, desarrollado en conejo. Usado 1:100
- Anti-Cubitus interruptus: DSHB (2A1), desarrollado en rata. Usado 1:25
- Anti-Engrailed: DSHB (4D9), desarrollado en ratón. Usado 1:50
- Anti-Ubx: cedido por R. White (White and Wilcox, 1985), desarrollado en ratón. Usado 1:25
- Anti-Nubbin: cedido por F. Díaz-Benjumea, desarrollado en conejo. Usado 1:250
- Anti-Rotund: cedido por F. Díaz-Benjumea, desarrollado en conejo. Usado 1:250
- Anti-Wingless: DSHB (4D4), desarrollado en ratón. Usado 1:50

Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos verdes, rojos y rojos lejanos se emplearon en una dilución 1:200 y proceden de Alexa Molecular Probes. También se empleó TO-PRO3 (en adelante TOPRO) de Invitrogen en dilución 1:500 para el marcaje de núcleos y Faloidina-Cy5 de Sigma a 1:200 para el marcaje de F-actina (en los discos imaginales, al disponerse el citoesqueleto de sus células de forma cortical, se emplea para marcar la membrana plasmática).

MS. TINCIONES X-GAL DE ALAS ADULTAS

Extrajimos faratos tardíos (con las alas oscuras) del pupario y les retiramos la membrana vitelina, cabeza y abdomen. Fijamos los tórax 1 hora a temperatura ambiente con glutaraldehído al 1%. La tinción con X-Gal la realizamos según el protocolo estándar. A continuación se colocaron los tórax en agua destilada hasta que se desplegaron las alas por completo. Las alas se montaron en glicerol.

MB. ADQUISICIÓN Y TRATAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron con equipos Leica TCS SPE y Zeiss LSM 510. Para la obtención de los cortes ortogonales que mostramos, en el montaje de los discos imaginales se evitó su deformación por aplastamiento. Por su parte, las fotos de alas adultas se adquirieron

mediante un microscopio de campo claro Zeiss Axiophot.

Las medidas de tamaño de clones, dominios y compartimentos, la complejidad del borde A/P y el tamaño de las transgresiones de compartimento se midieron empleando el software Fiji-ImageJ y Adobe Photoshop. Los análisis estadísticos se realizaron mediante Microsoft Excel. Las pruebas estadísticas mostradas son “t de student”.

Para las cuantificaciones del grado de transgresión del borde A/P se tuvieron en cuenta únicamente las transgresiones en el *pouch* y el *hinge*, excluyendo las del *notum*, donde las tinciones para Ci y En no permiten definir el borde con precisión. El grado de interdigitación del borde A/P se midió dentro del *pouch* del ala según la fórmula (longitud real / longitud de una línea recta ideal). El ratio P/A se calcula según la fórmula (superficie posterior / superficie anterior).

m7. CÁLCULO DE ÍNDICES MITÓTICOS

Obtuvimos *stacks* de 20 secciones de cada disco teñido para el marcador de mitosis PH3, abarcando todo el espesor del disco. Se excluyen las figuras mitóticas correspondientes a las células adepiteliales (con un origen que no es imaginal y se encuentran adheridas al *notum*). En el caso de la ablación del dominio Rotund también excluimos las de la membrana peripodial. Se hizo una proyección máxima de estos 20 planos, y tras segmentar la imagen resultante en las regiones de interés, cuantificamos el número de figuras en cada región de forma automática mediante el software Fiji-ImageJ. El índice se calcula según la fórmula (número de figuras mitóticas) / (superficie de la región).

r. resultados



Respuesta sistémica e inmediata en la reconstrucción de dominios abiertos: el pouch del ala

12. Estudio del efecto de diferentes factores pro-apoptóticos

Como paso previo al estudio de los efectos de una ablación genética, examinamos los efectos en el disco imaginal del ala de diferentes factores inductores de apoptosis. Escogimos para ello la línea *rn-Gal4*, cuyo dominio de expresión en el *pouch* abarca casi el 40% de la superficie del disco (Figura m2A). En un genotipo *rn-Gal4 tub-Gal80^{TS}* sobreexpresamos durante 48 horas las construcciones UAS de los genes pro-apoptóticos *hid* y *rpr*, de los componentes de la vía JNK *eiger* y *hep^{CA}* (una forma constitutivamente activa del gen *hemipterous*), de *p53* y de un RNA de interferencia para el inhibidor de la apoptosis *diap1*.

Mostramos los resultados en la Figura r1. Una primera observación es que la cantidad de Caspasa3 activada es muy diferente en cada caso, siendo los inductores más eficientes UAS-*hid*, UAS-*p53* y UAS-*rpr*. Otro importante fenotipo es que *hep^{CA}*, *eiger* y *rpr*, además de generar apoptosis,

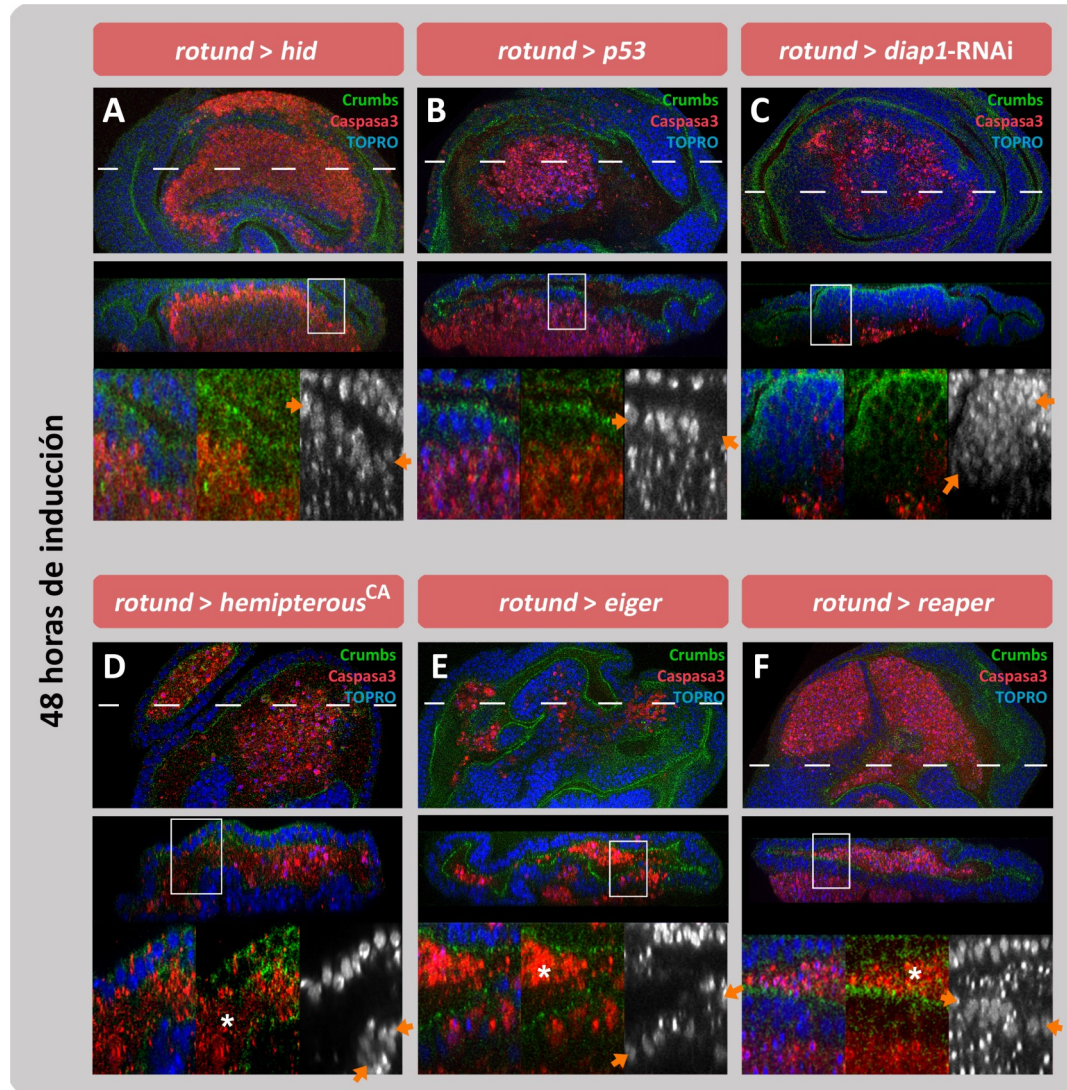


Figura R1. Comparación de efectos de diferentes pro-apoptóticos en el dominio Rotund. Se muestran los efectos tras 48 horas de inducción a 29°C de las construcciones: UAS-*hid* (A), UAS-*p53* (B), UAS-*diap1*-RNAi (C), UAS-*hep*^{CA} (D), UAS-*egr* (E-E') y UAS-*rpr* (F). Cada panel muestra un plano focal del *wing pouch*, una corte ortogonal en la posición indicada por la línea discontinua y una ampliación de la región recuadrada. En las secciones ortogonales se muestra siempre la membrana peripodial en la parte superior y el epitelio columnar (donde se expresa *rn-Gal4*) en la inferior. Nótese la presencia de pliegues ectópicos y otras alteraciones de la forma del disco en D, E y F. Para estos mismos paneles obsérvese, marcados por asteriscos, la presencia de restos apoptóticos atrapados en el lumen del disco (delimitado por las dos caras apicales enfrentadas, marcadas por la presencia del marcador apical Crumbs). Nótese asimismo que en ningún caso el epitelio queda roto, existiendo siempre un continuo de células vivas (núcleos no fragmentados), indicado con flechas naranjas. Ver también el diagrama de la Figura d2).

también provocan alteraciones profundas en la arquitectura del epitelio, observándose pliegues ectópicos (muy patentes en los casos de *hep*^{CA} y *eiger*) y la acumulación de restos apoptóticos en el lumen del disco (ver asteriscos en Fig. r1D, E y F). Este último hecho es notorio, por cuanto implica que las células en apoptosis están siendo extruidas por la cara apical del epitelio. Un proceso de extrusión apical no había sido descrito hasta el momento en la apoptosis en *Drosophila*. Como se observa, *hid*,

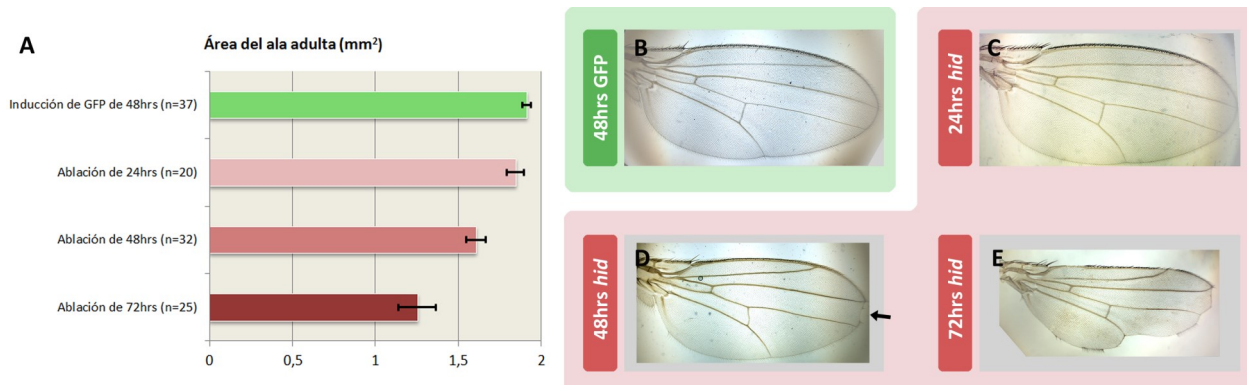


Figura R2. Efecto de la duración de la ablación en la capacidad de reparación del ala. (A) Tamaños, medidos en mm² de alas adultas sometidas a inducciones de GFP (control) o *hid* a 29°C tras 7 días de desarrollo a 17°C. (B-E) Ejemplos de alas sometidas a inducción de GFP durante 48 horas (B) o ablación con *Hid* durante 24 horas (C), 48 horas (D) o 72 horas (E). Con hasta 48 horas de inducción de *hid*, (el tratamiento estándar usado en este trabajo) con la excepción de ocasionales muescas en el margen del ala (flecha) y una pequeña reducción del tamaño final, el ala presenta capacidad de reparación completa. Las barras de error representan errores estándar (*= p<0,01).

p53 y *diap1*-RNAi provocan la extrusión basal de las células apoptóticas, *hep*^{CA} extrusión apical y por ambas caras en el caso de *eiger* y *rpr* (ver esquema de Fig. d2 en la sección de Discusión). Desconocemos las causas de las diferencias en estos efectos morfológicos, pero para este estudio hemos decidido emplear UAS-*hid* como inductor de muerte principal (junto al UAS-*p53* en determinados experimentos de comprobación), al ser el que provocando una mayor cantidad de apoptosis no parece inducir otros efectos en el epitelio.

Otra observación de interés es que en ninguno los casos llega a perforarse el epitelio: siempre se mantiene un continuo de células vivas en la parte apical (ver núcleos comprendidos entre las flechas), detectándose además la integridad de la cara apical, determinada por el marcador *Crumbs*. Esto contrasta con trabajos anteriores en los que se observó que *eiger* era capaz de romper el tejido y formar un agujero, empleando, sorprendentemente, el mismo protocolo que aquí se muestra (Smith-Bolton et al., 2009).

1.1. Efectos de la duración del tratamiento de ablación

Para conocer la capacidad de reconstrucción del ala tras sobreexpresar *hid* y cuál es la duración de la ablación que es compatible con una correcta reconstrucción, sometimos a larvas del genotipo UAS-*hid tub*-Gal80^{TS}; *rn*-Gal4 a ablaciones de 24, 48 y 72 horas comparándolas con controles UAS-GFP *tub*-Gal80^{TS}; *rn*-Gal4 con una inducción de la expresión de GFP de 48 horas. Tras estas inducciones devolvimos las larvas a 17°C para permitir la recuperación del ala y observar el fenotipo adulto.

En términos de superficie del ala, ninguno de los 3 tratamientos reduce notoriamente el tamaño final de ésta (Fig. r2A), teniendo en cuenta que un protocolo de ablación continua impide la recuperación de la estructura (datos no mostrados). La excepción es la inducción de 72 horas, que lleva a una reducción del tamaño de en torno a un tercio. En cuanto a la forma y el patrón del ala, nuevamente no se encuentran defectos con inducciones de 24 horas (Fig. r2C) o 48 horas (Fig. r2D) salvo ocasionales muescas en el margen del ala en el segundo caso (ver flecha en Fig. r2D). Sin embargo 72 horas de inducción sí provocan grandes pérdidas del margen del ala o incluso pérdida de venas.

Los resultados muestran que la máxima ablación que conlleva una recuperación casi completa es de 48 horas. Por tanto en adelante es la que utilizamos como protocolo estándar. El resultado, muestra además que el tratamiento de inducción de *hid*, además de inducir mayores niveles de apoptosis (Fig. r1) permite una reconstrucción casi completa de tamaño y patrón, algo muy distinto de lo descrito para *eiger* o *rpr* (Smith-Bolton et al., 2009).

FIG. 1C. La reconstrucción del ala es realizada por células ajenas al pouch de forma simultánea a la ablación

Los resultados anteriores muestran que el disco imaginal de ala posee una importante capacidad de recuperar partes perdidas tras una ablación genética, mayor a la descrita en estudios previos. Esta reconstrucción podría ser llevada a cabo tanto por células supervivientes del propio *pouch* como por células del *hinge* que accedieran al dominio Rn y sustituyeran a las dañadas.

Para estudiar este origen del dominio reconstruido añadimos al sistema la expresión de una recombinasa (UAS-Flp) junto a un *cassette act>stop>LacZ* para marcar de forma indeleble las células que originariamente conforman el dominio Rn (ver Materiales y Métodos). Tras 48 horas de inducción a 29°C en un genotipo UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* / + ; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (Fig. r3B) observamos una correspondencia completa entre las células apoptóticas y las positivas para la marca de linaje. En un control UAS-GFP / *tub-Gal80^{TS}* ; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* se ve también que la totalidad de células positivas para GFP además expresan el marcador de linaje β gal (Fig. r3A), lo que demuestra que una inducción de 48 horas en ambos genotipos es lo bastante eficiente como para hacer recombinar el *cassette* en el 100% de las células.

Para conocer el alcance del daño provocado, realizamos una estimación de la cantidad de células eliminadas con el protocolo. En inducciones de 24 horas de los genotipos anteriores, en cortes

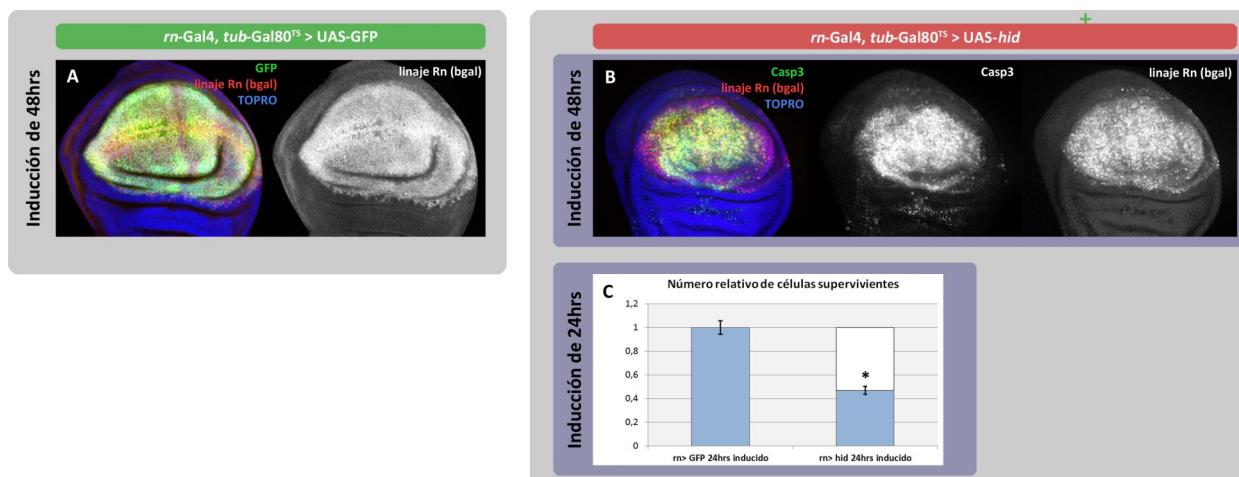


Figura R3. Resultado de la ablación en el dominio Rotund. Discos de ala de genotipos UAS-GFP/*tub-Gal80^{TS}*; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) (A) y UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* / +; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (B) tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C. (C) Medición estimada del número relativo de células supervivientes en los anteriores genotipos tras 24 horas de inducción (número de células positivas para LacZ contadas en un corte ortogonal perpendicular al borde A/P). Las barras de error representan errores estándar (*= $p < 0,01$). $n=5$.

ortogonales perpendiculares al borde A/P (a la altura de ancho máximo del dominio Rn) recontamos el número de células supervivientes (positivas para el marcaje de β gal) todavía integradas en el tejido. El resultado es que al menos un 55% de las células ya han sido eliminadas (Fig. r3C). Extrapolar este resultado supone que tras 48 horas de tratamiento la totalidad del dominio es eliminado. Esta cálculo podría ser incluso una subestimación, ya que de esas 24 primeras horas sólo han sido efectivas las 18 últimas, puesto que está descrita una perdurancia del *Gal80^{TS}* de en torno a 6 horas que retarda la expresión del *Gal4* (Bergantinos et al., 2010a).

Ante la aparente contradicción de que con 48 horas de ablación el dominio entero pueda ser eliminado pero sin embargo nunca dejan de encontrarse células vivas en la parte más apical del epitelio (Fig. r1A), decidimos analizar la dinámica temporal de la ablación y del linaje Rn.

Fijamos discos de los genotipos anteriores tras diferentes tiempos de ablación, analizando el epitelio en cortes ortogonales. En discos control con sobreexpresión de GFP (Fig. r4A-E) puede observarse cómo el dominio, marcado por GFP, va adquiriendo el marcaje con β gal: éste es amplio tras 24 horas de inducción y con 32 horas resulta totalmente coincidente con el patrón del gen *rn* (marcado con UAS-GFP). Al sobreexpresar *hid* (Fig. r4F-J, paneles derechos), desde las 16 horas empieza a encontrarse inducción de apoptosis (Fig. r4F), que alcanza niveles considerables a partir de 24 horas (Fig. r4G), momento a partir del cual se observa una acumulación de restos apoptóticos extruidos por la cara basal. Observando la evolución del linaje Rn (paneles centrales), se encuentra una adquisición progresiva de β gal en el dominio hasta las 24 horas. Sin embargo entre las 24 y las 48 horas las células

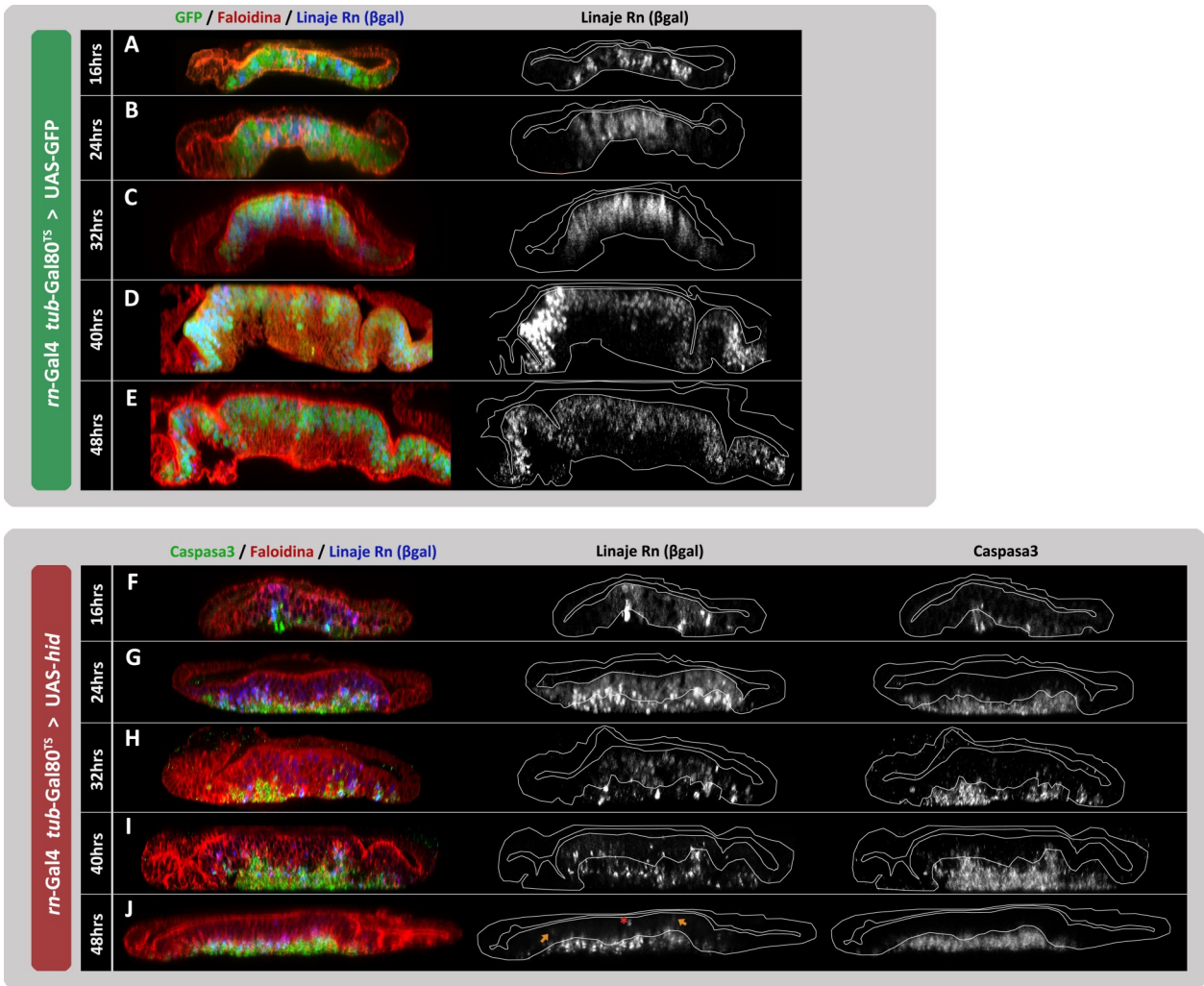


Figura R4. Descripción temporal de la ablación en el dominio Rotund. Cortes ortogonales perpendiculares al borde A/P (en el punto de máxima anchura del dominio Rn) de genotipos UAS-GFP/*tub-Gal80^{TS}*; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) (A-E) y UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* /+; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (F-J). Los tiempos de inducción de expresión a 29°C aparecen indicados a la izquierda, y el contorno del epitelio vivo (excluidas las células apoptóticas) se marca con una línea blanca. Nótese como en toda la secuencia de inducción de *hid* en ningún momento se pierde la integridad del epitelio debido a que el linaje Rn es sustituido por células no marcadas. Al final de las 48 horas de inducción (J) se observan unas pocas células supervivientes del antiguo dominio (asterisco rojo) y las células que lo repueblan empiezan a adquirir bajos niveles de βgal (flechas naranjas). Los cortes se muestran con la membrana peripodial arriba y el epitelio columnar abajo (quedando de este último, pues, su parte apical arriba y la basal abajo).

positivas para βgal van siendo progresivamente extruidas del epitelio y en su posición se encuentran células no marcadas. En última instancia, tras 48 horas (Fig. r4J) se observan muy esporádicamente células todavía integradas en el epitelio del dominio Rn eliminado. También entre las células no marcadas se encuentran células con niveles muy bajos de βgal, observación que podría ser compatible con una adquisición reciente y *de novo* de expresión del gen *rn*, y por tanto, de este marcaje.

Estos resultados apuntan en primer lugar a que el dominio Rotund está siendo remplazado en su totalidad por células con un origen exterior al propio dominio. Esto es coherente con lo mostrado en

anteriores trabajos (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a), si bien en estos trabajos la proporción remplazada es mucho menor, lo que llevó a concluir a los autores que la mayor parte de la reconstrucción es probablemente por parte de células supervivientes del propio dominio.

Otra observación todavía más importante es que este proceso de reconstrucción es simultáneo al de ablación y no requiere de un periodo de recuperación en el que se inactive el Gal4 (a diferencia de los trabajos citados): al final del proceso de ablación el dominio parece estar ya reconstruido. En ningún momento se pierde la integridad del epitelio, y esta integridad parece mantenerse por la contribución de células originadas fuera del dominio Rn.

No obstante, la entrada de nuevas células dentro del territorio que atribuimos al *pouch* del ala no implicaría un verdadero remplazo del dominio salvo que fueran capaces de adquirir la identidad de este territorio. Por ello analizamos la presencia de los marcadores del *pouch* Rotund (Fig. r5A-C) y

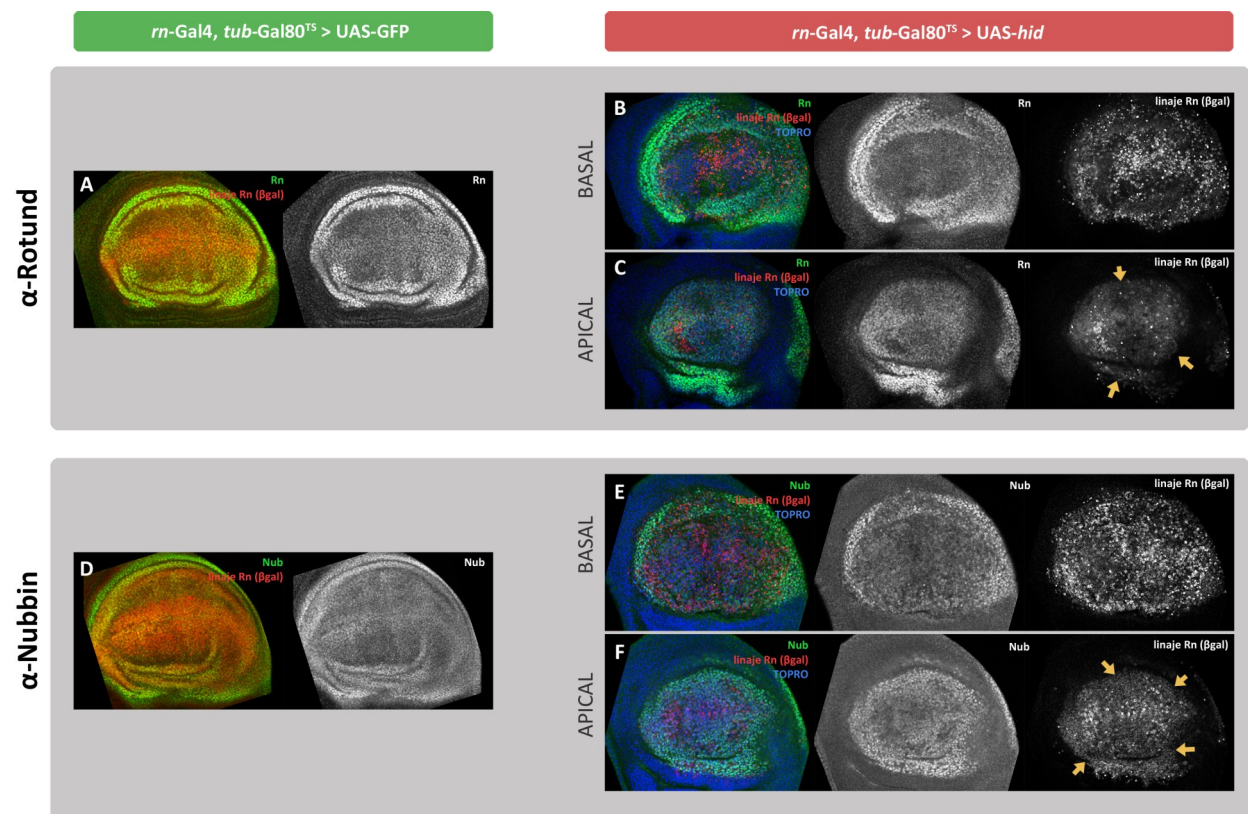


Figura R5. Las células que reconstruyen el dominio *rn* ganan los marcadores Rn y Nub. Discos de ala de genotipos *UAS-GFP/tub-Gal80^{TS}; rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) (**A y D**) y *UAS-hid tub-Gal80^{TS} / +; rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (**B-C, E-F**) tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C. Se puede observar como tras la inducción de *hid*, en la parte apical del epitelio, las células tienen actividad de los marcadores de *pouch* Rotund (**C**) y Nubbin (**D**). Nótese además que estas células apicales que expresan estos marcadores presentan bajos niveles de actividad del marcador LacZ (flechas en **C y F**) comparados con las células originales del dominio, ahora extruidas basalmente (**B y E**). Este hecho es explicable por una adquisición *de novo* y reciente de proteína Rn que lleva a recombinar el “cassette” con posterioridad.

Nubbin (Fig. r5D-F) en estas células al final del periodo de ablación de 48 horas. Encontramos la presencia de ambas proteínas especialmente en los planos apicales (Fig. r5C y F). Al adquirir la expresión de Rn, sería esperable que el *rn-Gal4* llevara a estas nuevas células a sobreexpresar *hid* y hacer recombinar el “cassette”. De forma consecuente, observamos que estas células positivas para Rn y Nub también presentan niveles más bajos del marcador de linaje que las células basales que están siendo extruidas.

Decidimos estudiar la composición del dominio Rn más allá del final del periodo de ablación devolviendo las larvas a 17°C para inactivar el Gal4, a la vez que ello impide que nuevas células adquieran el marcaje de linaje. Permitiendo 48 horas de recuperación encontramos que el linaje Rn queda reducido a pequeños parches (Fig. r6B) comparado con el linaje Rn control (con sobreexpresión de GFP, Fig. r6A). Comparando la proporción de estas células con el tamaño de los dominios Nub o Rn (casi co-extensivos, siendo el primero 2 filas de células más amplio que el segundo), encontramos que en promedio las células marcadas representan apenas un 30% del total (en algunos casos menos incluso del 2%). El 70% restante son por tanto células originadas fuera del dominio Rn (Fig. r6C). Este

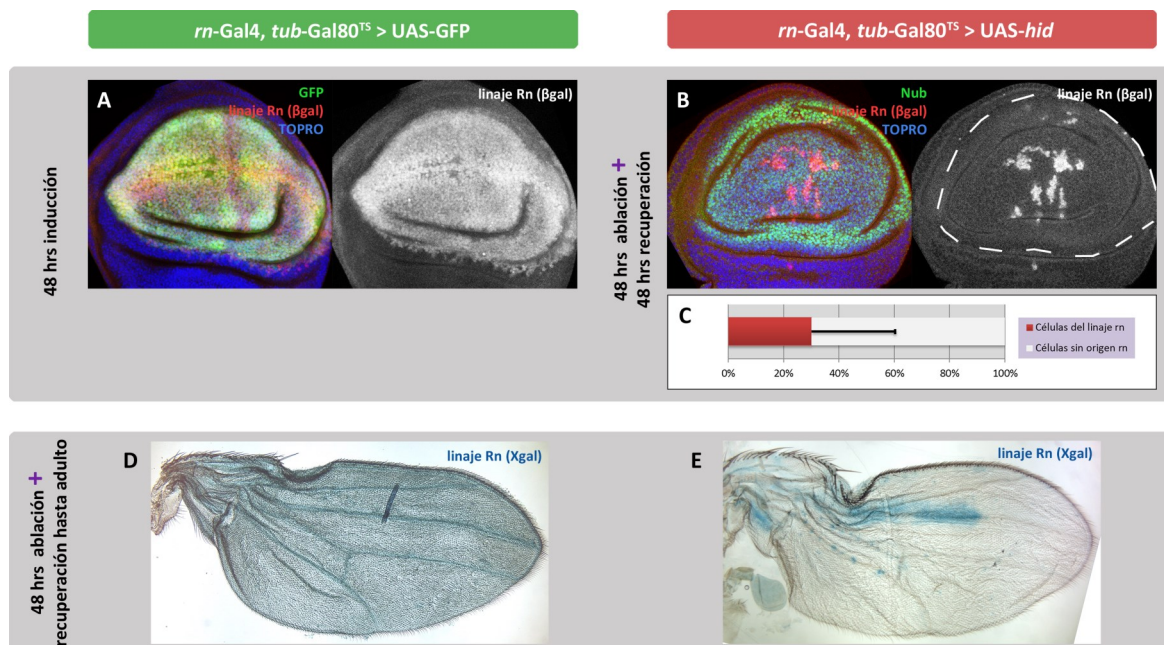


Figura R6. Reconstrucción completa del dominio Rn. Discos de ala de genotipos UAS-GFP/*tub-Gal80^{TS}*; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) (A) y UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* / +; *rn-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (B) tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C y 48 horas adicionales a 29°C en el caso de B. Nótese la clara reducción de células derivadas del linaje Rn en el panel B. Se muestra en línea discontinua el límite del marcador Nub. (C) Cuantificación de la contribución del linaje Rn al dominio Nub reconstruido. La barra de error representa la desviación típica. n=20. (D-E) Alas de faratos previos a la eclosión de los mismos genotipos anteriores teñidos con Xgal. Obsérvese que en el caso de inducción de *hid* (E) el linaje de Rn queda reducido a pequeños parches.

dato podría incluso ser una infravaloración, puesto que como hemos visto al final de la ablación las células de origen exterior expresan Rn y algunas de ellas han recombinado el *cassette*. Por ello es probable que una buena parte de ese 30% corresponda también a células procedentes del exterior.

Permitiendo la recuperación hasta la fase adulta encontramos nuevamente que mientras que en un control de sobreexpresión de GFP de 48 horas la marca del linaje Rn abarca completamente el ala adulta (Fig. r6D), en el caso de sobreexpresión de *hid* durante 48 horas la contribución del linaje original a la ala adulta es muy pequeña (Fig. r6E).

14. Ablación y reconstrucción del dominio Sal

Para comprobar la validez general de los resultados obtenidos en los experimentos de ablación del dominio Rn, hemos realizado experimentos similares en otro dominio del *pouch* del ala: el que define la línea *sal-Gal4* (Fig. m2B). Este dominio representa alrededor de un 16% de la superficie total del disco y su expresión comienza al inicio del estadio larvario 3, que corresponde precisamente con el momento en el que según nuestro protocolo iniciamos la ablación (día 7 del desarrollo a 17°C).

De forma análoga a lo explicado en el apartado anterior hicimos un marcaje del linaje Sal simultáneo a la expresión de *hid* o GFP en este dominio. Estudiamos la progresión temporal de este linaje comparando los genotipos *sal-Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80^{TS}* ; *UAS-Flp act>stop>LacZ* / + (control) (Fig. r7A-B) y *sal-Gal4/UAS-hid tub-Gal80^{TS}* ; *UAS-Flp act>stop>LacZ* / + (Fig. r7C-D). De forma análoga a lo observado para *rn-gal4*, el marcaje abarca la totalidad del dominio a partir de 24 horas de inducción. En el caso de sobreexpresión de *hid*, durante todo el proceso se detectan también células apoptóticas extruidas de forma basal (ver tinción punteada de TOPRO). A las 48 horas de inducción de *hid* (Fig. r7D), la mayor parte de células del linaje Sal ya han sido extruidas y remplazadas por otras sin marcaje de β gal o con un marcaje muy tenue (adquirido *de novo*). Este dominio reconstruido presenta ya expresión de la proteína Sal. Nuevamente nos encontramos con que el mecanismo de respuesta es simultáneo a la ablación y permite mantener la integridad del epitelio gracias a que células con un origen exterior al dominio Sal son capaces de repoblarlo.

Asimismo, analizamos la contribución del linaje Sal dañado y de las células exteriores a éste al dominio Sal reconstruido tras un periodo adicional de 48 horas de recuperación (inactivando el Gal4 a 17°C). De forma parecida a lo encontrado para *rn-Gal4*, pueden detectarse una gran cantidad de células que aunque expresan el marcador Sal no pertenecen a su linaje, indicando un origen exterior (Fig. r8B). Esta contribución de células no derivadas del dominio Sal asciende, en promedio, hasta el

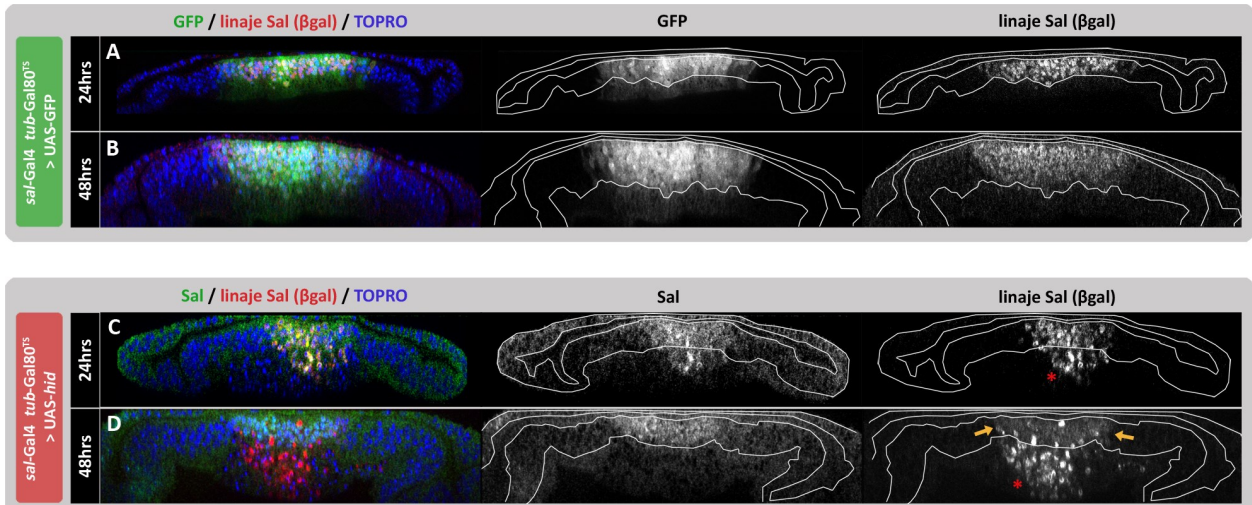
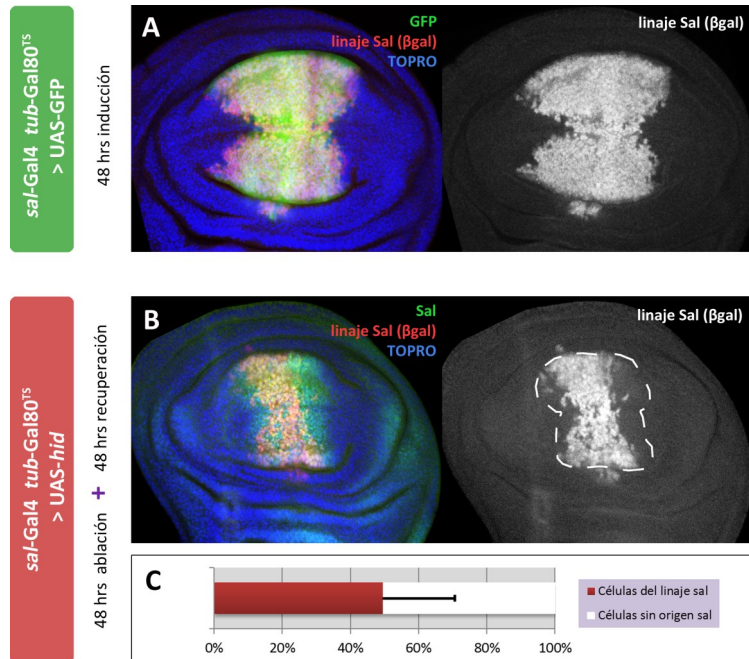


Figura R7. Ablación en el dominio Spalt. Cortes ortogonales perpendiculares al borde A/P (en el punto de máxima anchura del dominio Sal) de genotipos *sal-Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80^{TS}*; *UAS-Flp act>stop>LacZ* / + (control) **(A-B)** y *sal-Gal4/UAS-hid tub-Gal80^{TS}*; *UAS-Flp act>stop>LacZ* / + **(C-D)**. Los tiempos de inducción de expresión a 29°C aparecen indicados a la izquierda, y el contorno del epitelio vivo (excluidas las células apoptóticas) se marca con una línea blanca. Las células apoptóticas que son extruidas basalmente se indican con asteriscos (también detectables los fragmentos nucleares en la tinción con TO-PRO). Obsérvese que tras 48 horas de inducción de *hid* **(D)** hay presentes células positivas para la proteína Sal, pero que estas no forman parte del antiguo dominio Sal (con tinción fuerte para βgal) si bien tienen niveles bajos de actividad βgal (flechas naranjas), indicando que la adquisición *de novo* de identidad *sal* ha llevado a recombinar el *cassette* con posterioridad. Los cortes se muestran con la membrana peripodial arriba y el epitelio columnar abajo (quedando de este último, pues, su parte apical arriba y la basal abajo).

Figura R8. Reconstrucción del dominio Sal. Discos de ala de genotipos *sal-Gal4 UAS-GFP/tub-Gal80^{TS}*; *UAS-Flp act>stop>LacZ* / + (control) **(A)** y *sal-Gal4/UAS-hid tub-Gal80^{TS}* / +; *sal-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* **(B)** tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C y 48 horas adicionales a 17°C en el caso de **B**. Puede observarse una gran cantidad de células con un origen diferente al linaje Sal previo a la ablación, pero que ahora forman parte del dominio Sal, expresando este marcador (células verdes y no rojas en **B**). Se muestra en línea discontinua el límite del marcador Sal. **(C)** Cuantificación de la contribución del linaje Sal previo a la ablación al dominio *sal* reconstruido. La barra de error representa la desviación típica. n=12.



50% (Fig. r8C). Sin embargo es posible que de nuevo este dato sea una subestimación ya que, como se mostraba en la Figura r7D, muchas de estas células adquieren *de novo* la marca de linaje.

12. El marcaje de células exteriores al dominio Rn corrobora el origen de las células que lo reconstruyen

El empleo de un marcaje de linaje para las mismas células que sufren la ablación supone un marcaje negativo. Es decir: concluimos que ha ocurrido una transgresión porque se observa la ausencia de un marcador. Si por alguna causa durante la ablación con *hid* no recombinara el cassette en el 100% de las células del dominio, lo mostrado sería un artefacto. Por ello, optamos por hacer un marcaje positivo de las células exteriores al dominio Rn. Sin embargo, al emplear el sistema Gal4/UAS/Gal80^{TS} para inducir muerte no puede hacerse un marcaje de linaje basado en una segunda línea Gal4 que sea independiente, puesto que los UAS se expresarían de forma cruzada en ambos territorios. Por ello recurrimos a un sistema binario alternativo.

La línea *GH146-QF* tiene descrito un patrón de expresión en las neuronas olfativas del sistema nervioso central (Potter et al., 2010). En esta tesis, hemos podido describir que además presenta expresión desde el comienzo del tercer estadio larvario en el disco imaginal de ala en dos regiones proximales del *hinge* (Fig. m2E). Estas 2 regiones son aproximadamente complementarias al dominio Rn (si bien existe un cierto solapamiento). Se aprovechó este hecho para diseñar un experimento en el que *rn-Gal4* es empleado para dirigir la expresión de UAS-*hid*, mientras que *GH146-QF* dirige independientemente la de un QUAS-Flp que hace recombinar un *cassette ubi>stop>GFP* para marcar el linaje de este segundo dominio (Fig. r9A). Marcando no la expresión, sino el linaje de estas células, incluso aunque se movieran de su posición original y perdieran la expresión del QF mantendrían la del GFP. Es por ello que una posible participación de las células *GH146* en la reconstrucción del *pouch* podría identificarse con una expansión del linaje de este gen.

Como se puede observar en la Fig. r9B el diseño experimental funciona según lo esperado, y tras 2 días de inducción a 29°C encontramos apoptosis en el *pouch* del ala mientras que de forma independiente queda marcado el linaje *GH146* con proteína fluorescente GFP. Estudiamos la contribución de este linaje a la reconstrucción del dominio Rn tras 2 días de ablación a 29°C y 2 días de recuperación a 17°C, comparando entre discos del genotipo UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* / QUAS-Flp *ubi>stop>GFP* ; *rn-Gal4/GH146-QF* (Fig. r9D) y discos control de igual genotipo pero sin *rn-Gal4* (Fig. r9C). Como se observa en la gráfica de la Fig. r9E, la contribución normal del linaje *GH146* supone un

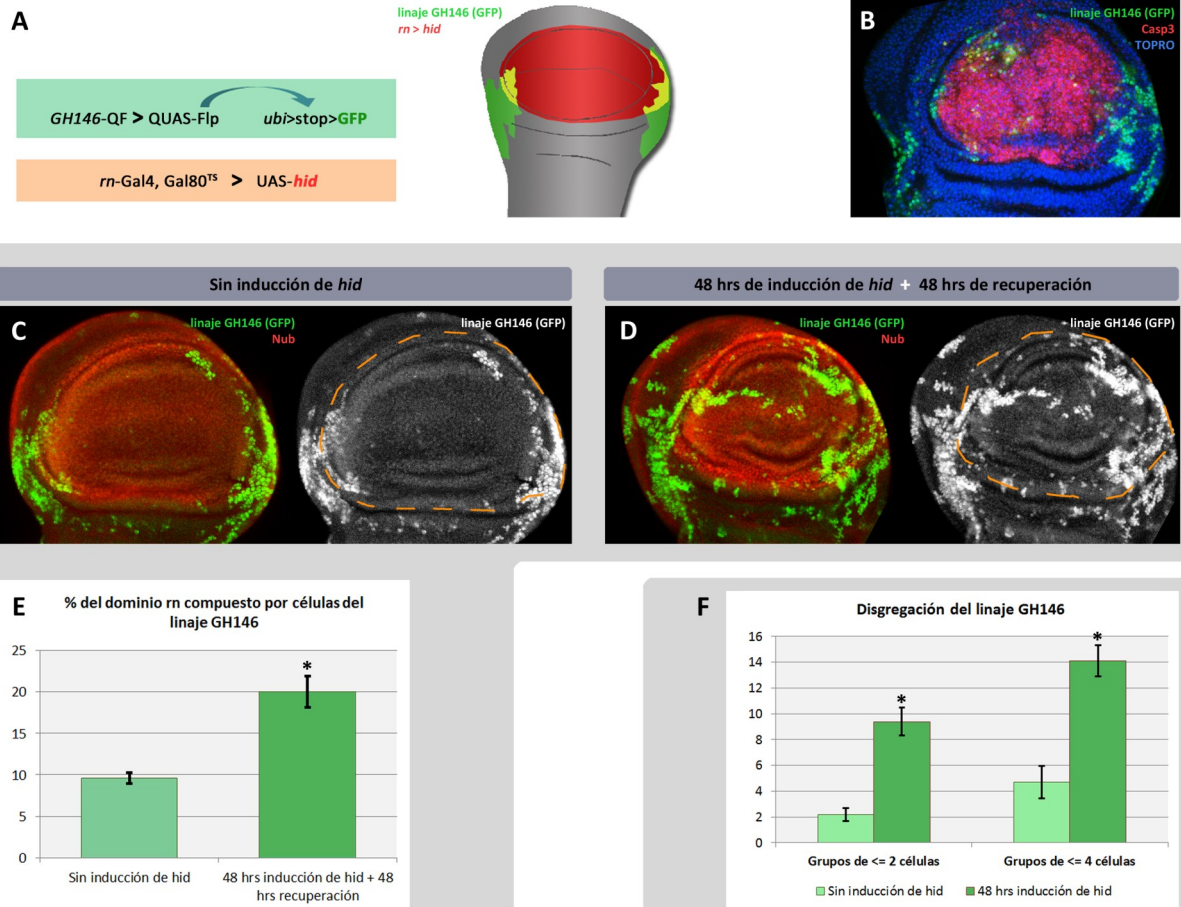


Figura R9. Empleo del sistema QF/QUAS para marcar las células exteriores al dominio *rn*. (A) Esquema de la estrategia genética empleada, en la que *rn*-Gal4 es utilizado para inducir la ablación provocada por un UAS-*hid*, mientras que la línea GH146-QF dirige la expresión de una Flipasa que hace recombinar un *cassette*, que por ganancia de GFP marca este linaje. Los patrones de expresión de *rn* y GH146 son complementarios (excepto dos pequeñas regiones de solape). (B) Disco imaginal de ala del genotipo explicado tras 48 horas de inducción, en el que se puede observar como el diseño experimental, en efecto, induce muerte en el *pouch* e independientemente marca un linaje celular exterior. (C-E) Discos de ala tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C y 48 horas adicionales a 17°C del genotipo explicado (D) y de un control en ausencia del elemento *rn*-Gal4 (C). Nótese el aumento de la contribución del linaje GH146 al dominio Nub (delimitado por línea discontinua naranja) y la penetración de sus células a hacia puntos más interiores del *pouch*. (E) Cuantificación de dicha contribución en los 2 genotipos mencionados. $n \geq 17$. (F) Disgregación del linaje GH146, medida como el número de grupos aislados de menos de dos o menos de cuatro células dentro del dominio Nub en los dos genotipos anteriores. Obsérvese que usando ambos criterios de número de células se detecta una notable disgregación del linaje, que podría ser explicada por fenómenos de movimientos y/o reordenamientos de células durante la reconstrucción del dominio dañado. $n \geq 12$. Las barras de error representan errores estándar (*= $p < 0,01$).

9% del dominio Rn, pero este dato aumenta al 20% cuando se induce la ablación, pudiendo verse además grupos de células que acceden a posiciones mucho más distales del *pouch* (Fig. r9D). Dado que las células GH146 suponen una fracción pequeña de todas las que rodean el dominio Rn, esta notoria participación en el dominio refuerza la conclusión de que son las células exteriores al dominio Rn las que llevan a cabo su reconstrucción.

11F . *Durante la reconstrucción del pouch tienen lugar reordenamientos celulares*

Otra observación que realizamos del experimento anterior es la distribución de las células del linaje GH146 tras la ablación del dominio Rn. Además de un tamaño mayor de este dominio, encontramos prolongaciones, interdigitaciones e incluso disgregación, apareciendo grupos aislados de células (ver Fig. r9C-D). Estos fenómenos podrían ser el resultado de movimientos celulares. Puesto que en condiciones control el propio dominio GH146 es poco compacto y variable en cuanto a qué células lo forman, decidimos cuantificar el posible aumento de la disgregación de células con dos índices: número de grupos aislados de menos de 2 células y de menos de 4 células, que se encuentran dentro del dominio Rn tras 48 horas de inducción de *hid*. En la gráfica de la Figura r9F puede verse cómo, considerando cualquiera de los dos índices, hay un incremento de entre 3 y 5 veces del número de células aisladas.

Durante el desarrollo normal de los discos imaginales no tienen lugar movimientos celulares, y prueba de ello es que las células que forman cualquier clon permanecen siempre en contacto. Por ello este resultado es un indicio de la existencia de movimientos celulares análogos a los que ocurre durante el cierre de heridas. Sin embargo no contamos con resultados que demuestren que esta movilidad celular es necesaria para la reparación del dominio.

11Q . *La ablación del dominio Rn provoca una respuesta proliferativa sistémica en todo el disco imaginal de ala*

Como hemos mostrado, la ablación del dominio Rn no impide que el *pouch* recupere su tamaño tras 72 horas (Fig. r6B) y el ala adulta tenga un tamaño muy similar al de individuos controles (Fig. r2A). Esto indica que existe una proliferación adicional por parte del resto de células del disco que restituiría el número de células previo. Existen a priori dos posibilidades en cuanto al patrón proliferativo: **a)** que este incremento se limite exclusivamente a la región cercana al dominio Rn, de una forma análoga al blastema local descrito en experimentos de cortes de discos imaginales (Bosch et al., 2008) y de otros organismos (Chera et al., 2009; Chera et al., 2011) o **b)** que exista un aumento de proliferación en todo el disco, indicando que el tejido completo se comporta como un blastema.

Trabajos previos de ablación genética han mostrado que el dominio Rn se reconstruye no con un aumento de la proliferación local, sino mas bien mediante una parada generalizada del ciclo celular en todo el disco excepto en los bordes de este dominio, que siguen proliferando a una tasa normal (Smith-Bolton et al., 2009). Otro trabajo encontró en cambio que al eliminar un dominio más pequeño, como

Patched, se induce un incremento proliferativo, que empieza siendo local y se extiende a más regiones en fases posteriores de la reconstrucción (Bergantinos et al., 2010a).

Dadas las diferencias encontradas hasta el momento de nuestro sistema de ablación con los trabajos descritos, decidimos analizar el patrón proliferativo que sigue a la ablación con *hid*. Para ello comparamos tinciones con el marcador de fase M del ciclo celular PH3 de discos control UAS-GFP *tub-Gal80TS* ; *rn-Gal4* con experimentales UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* ; *rn-Gal4*. Tras la ablación, apreciamos una aparente falta de células proliferando en el *pouch* al observar planos basales (Fig r10B). Con los resultados de apartados anteriores, sabemos que en posiciones más apicales a los cúmulos de restos

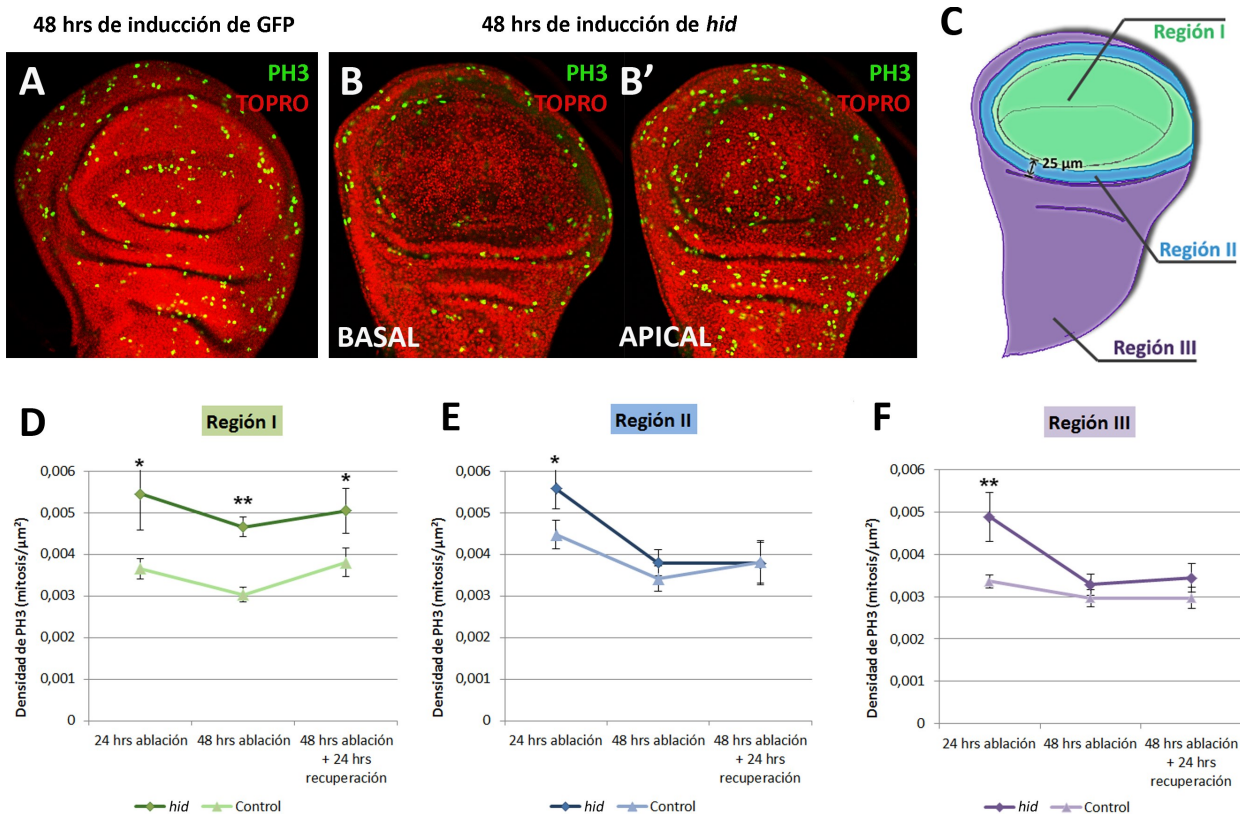


Figura R10. Respuesta proliferativa ante la ablación del dominio Rn. (A-B') Proliferación, detectada mediante el marcador mitótico PH3 en discos con una inducción de 48 horas de GFP (**A**, control) o *hid* (**B-B'**, que representan respectivamente el plano basal y apical del mismo disco). Nótese que tras la ablación con *hid*, aunque en el plano basal (**B**) aparentemente no se detecte proliferación en el *pouch*, observando el plano apical se puede ver que esta región sí está proliferando activamente. Obsérvese además la mayor proliferación con respecto al control. (**C-F**) Medición del índice mitótico, para la que se diferenciaron 3 regiones del disco de ala (esquematizado en **C**): región I, que representa el propio dominio Rn (**D**); región II que comprende un anillo de 25µm de ancho alrededor de la región anterior, en inmediato contacto pues con la zona de ablación (**E**); y región III que conforma el resto del disco imaginal (**F**). Las gráficas representan la densidad de PH3 (medida como número de figuras mitóticas por µm²) en los 3 momentos temporales indicados: 24hrs de inducción, 48hrs de inducción y 48hrs de inducción y 24hrs adicionales de no inducción. Las líneas claras corresponden al control de sobreexpresión de GFP, las oscuras a la de *hid*. Obsérvese el incremento de proliferación de alrededor del 50% en las 3 regiones en las primeras fases del proceso, que acaba restringiéndose a la región I con el transcurso del tiempo. Las barras de error representan errores estándar (*= $p<0,05$; **= $p<0,1$). $n=15$ para cada genotipo y tiempo.

apoptóticos existe una capa de células procedente de regiones contiguas. Estudiando una posible proliferación de estas células en los planos apicales, encontramos que no sólo estaban proliferando activamente, sino que todo el disco contiene más figuras mitóticas que el control (comparar Fig. r10B' con r10A).

Para analizar con más detalle este incremento proliferativo medimos índices mitóticos (ver detalles en la sección M7) diferenciando 3 regiones del disco (Fig. r10C): una región I que corresponde al propio dominio Rn que sufre la ablación; una región II que abarca las células en un entorno de 25µm de distancia de la región I, y que en caso de que la respuesta proliferativa fuera local sería la que reaccionaría con más claridad; y una región III que comprende el resto del disco. Comparamos la proliferación de los 2 genotipos indicados en el párrafo anterior en una serie temporal que va desde las primeras 24 horas de inducción hasta 24 horas de recuperación tras 48 de inducción de expresión. Mostramos los resultados en las gráficas de la Figura r10D-F. Encontramos un incremento significativo de la proliferación de en torno a un +50% en las tres regiones del disco tras 24 horas de inducción de *hid*. En los siguientes puntos temporales estudiados se encontró que las regiones II y III retoman una tasa proliferativa similar a los controles, manteniendo sólo la región I una tasa acelerada. No obstante, es importante recordar que a partir de las 48 horas de inducción el dominio ya ha sido remplazado por células exteriores, por lo que esta proliferación extendida corresponde a células que originalmente formaban parte de las regiones II o III.

Para corroborar esta aparente respuesta proliferativa global, llevamos a cabo un análisis clonal utilizando un *cassette* de ganancia de un marcador neutro. Estos clones son originados por recombinación mediada por un golpe de calor (ver Materiales y Métodos) y no afectan al crecimiento o proliferación celulares. Dado el aumento exponencial del número de células de discos imaginales, el tamaño de estos clones de células recapitula toda la proliferación sufrida desde el momento de inducción hasta el de disección de la larva. Al analizar el tamaño de estos clones en función de la posición que ocupa en el disco, podemos determinar diferencias proliferativas de cada región del disco.

Indujimos clones neutros (con ganancia del marcador GFP) simultáneamente al inicio de la inducción de expresión a 29°C en los genotipos *hs-Flp; UAS-hid tub-Gal80TS/+ ; ubiP63E>stop>GFP/+* (controles sin Gal4, Fig. r11A) y *hs-Flp; UAS-hid tub-Gal80TS/+ ; rn-Gal4/ ubiP63E>stop>GFP* (inducción de *hid*, Fig. r11B). Analizamos el tamaño de estos clones tras 48 horas a 29°C. Pudimos encontrar un notorio incremento en el tamaño de los clones tanto dentro del dominio Rn, donde duplican su tamaño (Fig. r11C), como fuera de éste, donde aumentan de tamaño independientemente de la distancia a la que se encuentren del borde del dominio (Fig. r11D). Como se ve en esta última gráfica,

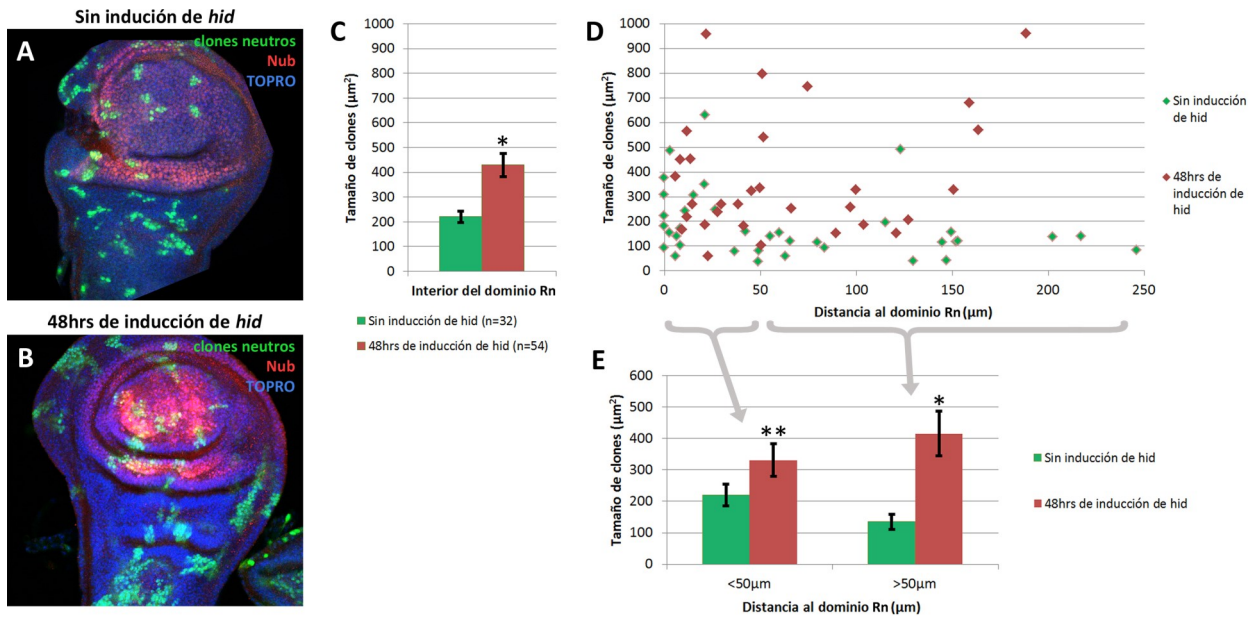


Figura R11. Análisis clonal de la proliferación tras la ablación del dominio Rn. (A-B) Clones de ganancia de GFP inducidos simultáneamente al cambio de temperatura a 29°C y medidos al final del periodo de inducción de 48hrs, en discos sin inducción de *hid* (A) y con inducción de *hid* (B). Gráficas del tamaño de estos clones en el interior (C) y exterior (D) del dominio Rn. En el segundo caso se representa tamaño frente a distancia al dominio Rn. (E) Datos del panel D agrupados en las categorías: clones a menos de 50µm y clones a más de 50µm de distancia. Obsérvese que el incremento del tamaño de estos clones, que aproximadamente se duplica, es homogéneo en todo el disco. n>20 discos por genotipo procedentes de 4 experimentos independientes. Las barras de error representan errores estándar. (*=p<0,05; **=p=0,07).

incluso los clones más alejados, situados en el notum aumentan claramente su tamaño. Si agrupamos estos datos de clones fuera del dominio Rn en 2 grupos, uno con los situados a menos de 50µm y otro con los que se encuentran a más de 50µm del borde del dominio Rn, observamos que en ambos grupos aproximadamente se duplica el tamaño de los clones(Fig. r11E). El que esta duplicación en el tamaño sea homogénea en todo el disco confirma la hipótesis de una respuesta sistémica.

No obstante, el hecho de que los clones que acceden del dominio Rn quedan sometidos a apoptosis hace pensar que su tamaño, de no sufrir apoptosis, podría ser todavía mayor al observado, y por tanto que el incremento de proliferación sea en este territorio todavía mayor al del resto del disco. Esta idea es compatible con el incremento de índice mitótico exclusivo de la región I en fases más tardías mostrado anteriormente. Por ello, podemos resumir que la respuesta proliferativa es sistémica, participando todo el disco en la reconstrucción de la región dañada, pero que superpuesto a este mecanismo puede existir otro de respuesta local.

R12. La actividad de la vía JNK es necesaria en las células que reconstruyen el pouch

Dado el papel descrito de la ruta JNK en estudios previos de regeneración (ver Introducción), probamos el efecto que tiene el bloquearla mediante la sobreexpresión de *puckered* (*puc*). Dadas las diferencias encontradas hasta el momento de nuestro sistema con estudios previos, estudiar esta vía puede validar si es un elemento común de los diferentes modelos de homeostasis y regeneración.

Inactivamos esta vía específicamente en las células exteriores al dominio Rn, para lo que se utilizaron simultáneamente las líneas *GH146-QF* y *rn-Gal4* que, como se explicó con anterioridad, tienen en el disco de ala patrones de expresión aproximadamente complementarios. Comparamos los genotipos *QUAS-puc QUAS-Flp ubi>stop>GFP / UAS-hid tub-Gal80^{TS}*; *GH146-QF/+* (Control sin expresión de *hid* por ausencia del Gal4, Fig. r12A) y *QUAS-puc QUAS-Flp ubi>stop>GFP / UAS-hid tub-Gal80^{TS}*; *GH146-QF / rn-Gal4* (experimental, Fig. r12B) tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C y 48 horas adicionales a 17°C. Con este diseño experimental en el dominio Rn se sobreexpresa *hid*, mientras que en el *GH146* se sigue su linaje a la vez que se sobreexpresa *puc* en sus células (ver Materiales y Métodos para información sobre el clonaje de la construcción *QUAS-puc*).

Encontramos que en las larvas control tiene lugar un retardo en el desarrollo, por lo que para este experimento retrasamos la inducción de la expresión del día 7 al día 9 de desarrollo a 17°C. El enhancer *GH146* tiene descrito su expresión en el sistema nervioso olfativo (Potter et al., 2010), por lo

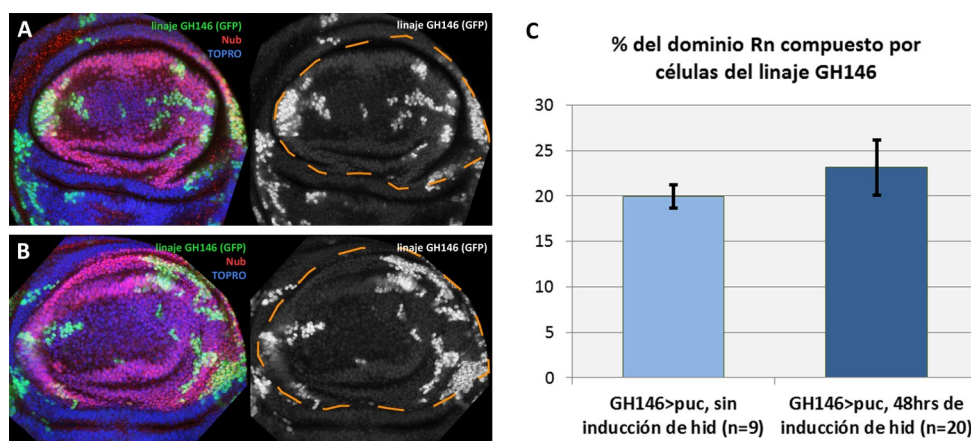


Figura R12. La actividad de la vía JNK es necesaria en las células que reconstruyen el dominio Rn. Discos imaginales de ala de los genotipos *QUAS-puc QUAS-Flp ubi>stop>GFP / UAS-hid tub-Gal80^{TS}*; *GH146-QF/+* (A) y *QUAS-puc QUAS-Flp ubi>stop>GFP / UAS-hid tub-Gal80^{TS}*; *GH146-QF / rn-Gal4* (B) tras 9 días de crecimiento a 17°C, 48 horas de inducción de expresión a 29°C y 48 horas adicionales a 17°C. (C) Cuantificación del porcentaje de linaje GH146 que forma parte del dominio Rn. Obsérvese que al bloquear la actividad de la vía JNK en las células GH146 mediante la sobreexpresión de su represor *puckered* (*puc*), se impide que este dominio participe con más células en el dominio Rn tras una ablación (comparar con Fig. r9E, donde sí hay una diferencia). Las barras de error representan errores estándar. $p=0,35$.

que defectos en el comportamiento alimentario u otros en la fisiología de la larva podrían explicar este retardo.

El resultado del experimento se muestra en la gráfica de la Figura r12C: el bloqueo de la ruta JNK en estas células lleva a que no puedan participar en el dominio Rn reconstruido en un grado mayor al que lo hacen en los controles. Como mostramos anteriormente, sin la condición de ganancia de *puc* el linaje GH146 accede al dominio Rn y duplica su participación tras una ablación (Fig. r9E). En este caso no tiene lugar de nuevo ese aumento, lo que implica una relevancia funcional de la vía JNK, y que es específica de las células que van a reconstruir el *pouch*.

Sin embargo, como se puede observar, el control ya supone un 20% del dominio Rn mientras que el control de la Figura r9E (en el que no había *puc* en sus células) era el 10%. No tenemos una explicación clara de este resultado, pero de nuevo podría atribuirse a que al expresarse la línea *GH146-QF* en otros tejidos, como el nervioso, tengann lugar fenómenos fisiológicos inesperados. No obstante, dado que control y experimento usan exactamente las mismas condiciones experimentales y el mismo fondo genético (a excepción de la presencia o ausencia del *rn-Gal4*), se puede sostener la conclusión antes expuesta.



Reconstrucción de dominios de linaje cerrados: cambios de identidad de compartimento

RE2. *Los compartimentos como dominios cerrados*

Los resultados mostrados previamente reflejan que existe una capacidad de homeostasis inmediata y sistémica cuando la región sobre la que se ha hecho la ablación es un dominio de linaje abierto. En un dominio de este tipo no existe restricción de linaje: por ejemplo, se sabe que durante el crecimiento del disco imaginal la descendencia de una célula localizada en el *hinge* puede acceder al *pouch* y viceversa. Al no existir ninguna restricción de crecimiento, no es inesperado, por tanto, que al eliminar células del *pouch* el *hinge* sea capaz de repoblarlo y que sus células cambien de identidad para reemplazarlo.

Esta situación no es, en cambio, aplicable a un dominio de linaje cerrado como un compartimento. Los compartimentos se originan a partir de un grupo de células llamadas policlones, cuyo linaje individual es indeterminado pero el conjunto mantiene una estricta determinación para

generar una estructura concreta (por ejemplo la parte anterior del ala o la región dorsal). El estado de determinación de un compartimento se perpetúa así a través del linaje de las células que lo originaron, no teniendo lugar el reclutamiento de nuevas células. No está descrito que células de un compartimento o segmento sean capaces de cambiar su identidad y formar parte de otro. Más aún, estudios previos de regeneración han deducido que tras una ablación, los bordes de compartimentos no se desorganizan y que sus células mantienen su identidad (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a).

No obstante, en los estudios mencionados nunca se ha hecho un análisis preciso de linaje que buscara específicamente este tipo de cambios de identidad. Por ello, se decidimos llevar a cabo un abordaje experimental similar al utilizado con anterioridad, induciendo apoptosis masiva en compartimentos a la vez que se rastrea el linaje del mismo compartimento en el que se produce el daño.

Nuestro objetivo de esta parte del trabajo es, por tanto, la búsqueda de estos fenómenos y utilizarlos para el estudio de cómo las células pueden cambiar su determinación genética para reconstruir tejidos.

Ablación del compartimento posterior del ala

Hemos decidido utilizar como modelo de dominio cerrado el compartimento posterior del ala, utilizando para su estudio la línea *hedgehog-Gal4* (*hh-Gal4*) que presenta un patrón de expresión fuerte y restringido a todas las células del compartimento posterior (Fig. m2C).

En primer lugar comprobamos la capacidad de inducir muerte del sistema y de marcar adecuadamente el linaje de este compartimento. Para ello comparamos el efecto de 48 horas de inducción a 29°C del genotipo control UAS-GFP / *tub-Gal80^{TS}* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (Fig. r13A) y del genotipo experimental UAS-*hid tub-Gal80^{TS}/+* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (Fig. r13B). Como puede observarse, en el caso de la ablación con *hid* se detectan elevados niveles del marcador apoptótico Caspasa3 en todo el compartimento posterior. Además de esto, en ambos genotipos la totalidad de las células de origen posterior adquieren la marca de linaje: en el control puede observarse una clara co-extensión entre las marcas GFP (expresión de la línea en el momento de disección) y β gal (linaje de todas las células del compartimento posterior), a la vez que en el experimental no se encuentran células posteriores que no hayan quedado marcadas. Nótese además, que en un número importante de casos tras la ablación, puede encontrarse como el borde del linaje

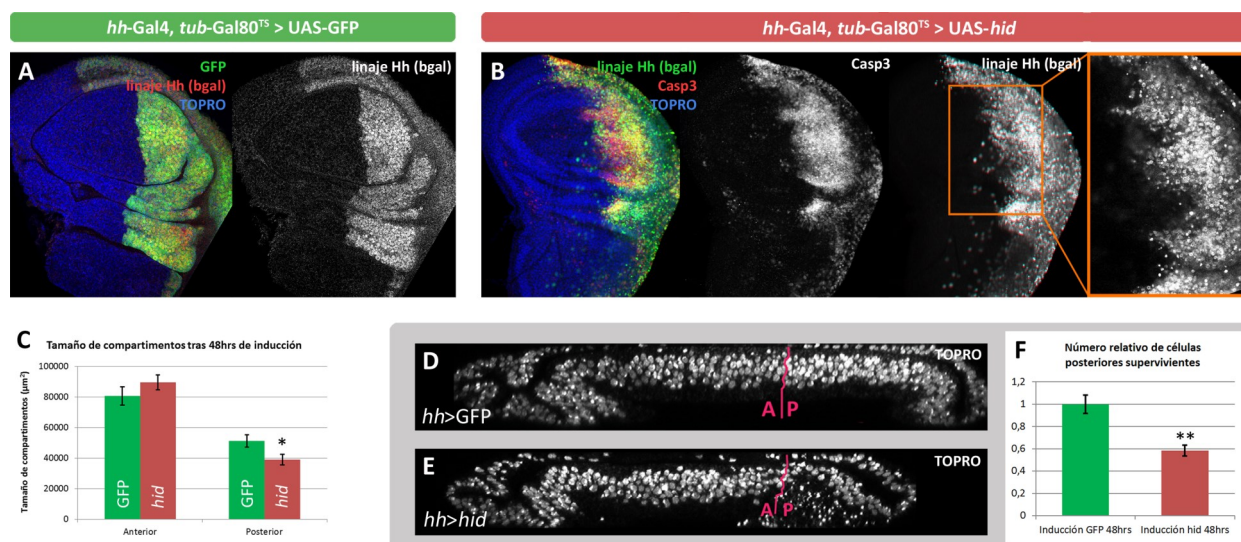


Figura R13. Ablación del compartimento posterior. Discos imaginales de ala de los genotipos *UAS-GFP/tub-Gal80^{TS}* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) (A) y *UAS-hid tub-Gal80^{TS} / +* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (B) tras 48 horas de inducción de expresión a 29°C. Nótese como la marca de linaje se adquiere en la totalidad de las células del compartimento posterior y la importante presencia de células apoptóticas en el disco experimental. Obsérvese también en la ampliación del panel B como en ocasiones el borde de compartimentos (visualizado como el linaje del compartimento posterior) deja de ser recto, observándose indentaciones. (C) Tamaño (medido como superficie) de los compartimentos anterior y posterior tras 48 horas de inducción de GFP o *hid*. Obsérvese la leve reducción del compartimento posterior y como el compartimento anterior mantiene su autonomía (n=16). (D-E) Cortes ortogonales perpendiculares al borde A/P en el punto de máximo ancho del disco de discos tras 48 horas de sobreexpresión de GFP (D) o de *hid* (E). Nótese que pese a la pequeña reducción de la superficie del compartimento posterior (antes mostrada en C, y aquí visualizable como el ancho del corte ortogonal), el número de núcleos vivos (excluyendo los restos apoptóticos, visibles como un punteado en la parte basal) sí se reduce notoriamente, a costa de un menor espesor del tejido vivo. La línea dibujada delimita el borde entre compartimentos. (F) Número relativo de núcleos en el compartimento posterior en cortes ortogonales como los mostrados en D-E (n=5). Este parámetro puede ser usado como estimación de la reducción real del compartimento. Las barras de error representan errores estándar. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

muestra un aspecto interdigitado cuando normalmente es recto (ver ampliación de Fig. r13B y apartado r2E).

Medimos los tamaños medios de los compartimentos anterior y posterior para evaluar el daño provocado por este tratamiento. El compartimento anterior, usado como control, no presenta ninguna reducción, pero sorprendentemente el posterior sólo ve reducida su área en un 25% tras la inducción de *hid* y a pesar de los elevados niveles de apoptosis (Fig. r13C).

Si bien los discos imaginales son epitelios monocapa, presentan pseudo-estratificación (es común observar en el *pouch* hasta 5 núcleos “apilados”, ver Fig. r13D), y como se mostró para el caso de la línea *rn-Gal4*, el epitelio mantiene la integridad pero a costa de un menor espesor. Si la misma situación se reprodujera aquí, la reducción real del compartimento, medido como número de células, sería mayor. Para ello analizamos cortes ortogonales de estos discos (Fig. r13D-E), encontrando, en

efecto, una patente disminución del número de células vivas (ver en Fig. r13E el menor espesor del epitelio del compartimento posterior). Al cuantificar el número de células posteriores vivas en este tipo de secciones ortogonales, observamos que quedan poco más de la mitad de células que un compartimento posterior control. Puesto que ésta es una medición lineal del número de células (se cuentan a lo largo de un eje) y el disco es bidimensional (puede haber reducción de células tanto a largo de un eje como del otro), es probable que el número real de células supervivientes sea bastante menor. Pese a que ésta no es una medición precisa, sí es una estimación que muestra que existe una importante eliminación de células tras 48 horas de inducción de *hid* en el compartimento posterior.

FIG. Las células del compartimento anterior son capaces de participar en la reconstrucción del posterior

En el mismo genotipo de inducción de apoptosis mostrado en el apartado anterior, decidimos permitir un periodo de recuperación de 72 horas a 17°C (adicional a las 48 horas de inducción) de cara a estudiar si células de origen anterior pueden participar en la reconstrucción del compartimento posterior. Hemos encontrado que de forma muy frecuente (2 de cada 3 discos, $n > 50$), como en los discos mostrados en los paneles A y B de la Figura r14, pueden encontrarse, siempre asociados al borde de compartimentos, grupos de células con un origen anterior (no poseen la marca del linaje Hh) que ya no presentan el marcador anterior *Cubitus interruptus* y se encuentran localizadas en una posición posterior (ver flechas rojas). Más aún, estos grupos de células presentan el marcador posterior *Engrailed* (Fig. r14D), demostrando que cambian su determinación celular de anterior a posterior de forma completa.

Por lo excepcional de este resultado, decidimos corroborarlo utilizando un inductor de apoptosis diferente a *UAS-hid*: *UAS-p53*, del que ya comprobamos su efectividad y ausencia de otros efectos fenotípicos (ver apartado R1A). En un genotipo *UAS-p53/tub-Gal80^{TS} ; hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ*, de nuevo pudimos distinguir este tipo de transgresiones, incluso de un tamaño y a una frecuencia mayores (Fig. r14C).

Quisimos conocer la temporalidad del proceso: si estas transgresiones son simultáneas a la ablación o sólo tienen lugar con posterioridad, durante el periodo de recuperación. Para ello observamos con mayor detenimiento los discos con inducción de *hid* al final del periodo de ablación, encontrando nuevamente, en el plano apical, células sin origen posterior que han adquirido identidad posterior y que aparentemente aún no han tenido tiempo para hacer recombinar el *cassette act>stop>LacZ* (Fig. r14D). Quisimos confirmar lo mostrado buscando la presencia de células realizando

la transición de identidad, que presentaran simultáneamente marcadores de ambos compartimentos. Para ello, como marca del compartimento posterior no empleamos el anticuerpo contra Engrailed, que muestra señal en unas pocas células anteriores del disco de larva 3 tardía (Blair, 1992; Hidalgo, 1994), sino una inserción LacZ en el *locus* de *engrailed*, que presenta un patrón exclusivamente posterior. En efecto, hemos sido capaces de detectar aisladamente células que presentan simultáneamente actividad Ci y actividad *en*-LacZ (Fig. r14E). Estos resultados nos hacen concluir que esta respuesta del compartimento anterior es inmediata y simultánea ante la ablación del compartimento posterior.

No sólo las células del compartimento anterior acceden al posterior: en los genotipos y tiempos mostrados también pudimos distinguir que células de origen posterior (marcadas positivamente para

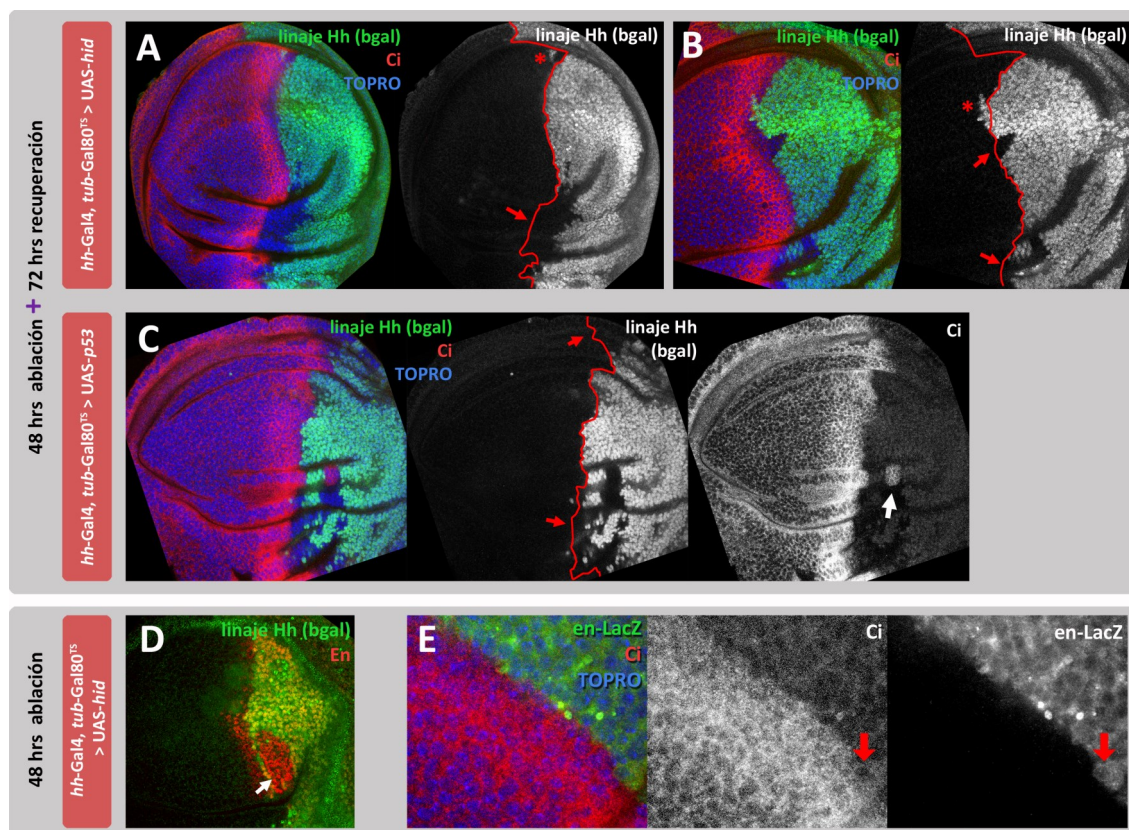


Figura R14. Las células del compartimento anterior participan en la reconstrucción del posterior. (A-C) Discos imaginales de ala de los genotipos *UAS-hid tub-Gal80^{TS} / + ; hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (ablación con *hid*) (A-B) y *UAS-p53 / tub-Gal80^{TS} ; hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (ablación con *p53*) (C) tras 48 horas de inducción y 72 horas adicionales de recuperación. Nótese en el borde A/P la presencia de grupos de células originadas en el compartimento anterior (sin marca de linaje posterior) que no expresan Ci, y por tanto están formando parte del compartimento posterior (flechas rojas). Asimismo, se observan células de origen posterior que expresan la marca del compartimento anterior Ci (asteriscos rojos). Nótese también que ocasionalmente una parte de las células en estas transgresiones del borde de compartimentos puede retener su identidad original (flecha blanca en C). (D-E) Discos del genotipo de ablación por *hid* al final del periodo de inducción de 48 horas. (D) También al final de esta fase de ablación pueden detectarse grupos de células de origen anterior que no solo pierden la marca Ci sino que ganan la marca de compartimento posterior En (flecha blanca). (E) Es posible, incluso, encontrar células realizando la transición de identidad, como muestra el que algunas pueden presentar simultáneamente proteína Ci y actividad transcripcional de *en* (mostrada por el reportero *en*-LacZ) (flecha roja).

el linaje Hh) pasan a formar parte del compartimento anterior, mostrando actividad Ci (ver asteriscos rojos en Fig. r14A-B). En los controles de sobreexpresión de GFP, de forma muy esporádica (1 de cada 6 discos), pueden encontrarse en torno a 2-4 células anteriores, siempre localizadas en torno al borde D-V, que pueden marcarse para el linaje Hh. Sin embargo, lo encontrado en los genotipos experimentales es muy distinto de este comportamiento de la línea *hh-gal4*, pues estas transgresiones aparecen en cualquier punto del borde A/P, son de un tamaño mayor y aparecen más frecuentemente (1 de cada 3 discos). Este hallazgo resulta imprevisto, pues dado que la ablación la estamos provocando precisamente el compartimento posterior, no es esperable que células dañadas pasaran a ingresar en el compartimento anterior. Nuestra interpretación es que la ablación de uno de los dos compartimentos lleva a alguna forma de colapso transitorio del borde entre ambos, mezclándose las células de ambos orígenes y re-especificándose a la identidad que corresponde a sus nuevas posiciones.

Puesto que esta no-autonomía de los compartimentos en su respuesta ante ablación contradice lo expuesto en estudios recientes de regeneración (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a), decidimos confirmar la existencia de estas transgresiones mediante un análisis clonal. El objetivo fue encontrar la presencia de clones que presenten células en ambos compartimentos simultáneamente, de forma parecida a lo realizado en estudios clásicos (Szabad et al., 1979; Brower et al., 1981). No obstante, estos estudios de clones simples presentan la incertidumbre de posibles falsos positivos provocados por la unión de un clon de origen anterior con otro de origen posterior. Para reducir esta posibilidad, llevamos a cabo un sistema de generación de clones gemelos (ver Materiales y Métodos). La hipótesis es que si las células anteriores pueden acceder al compartimento posterior,

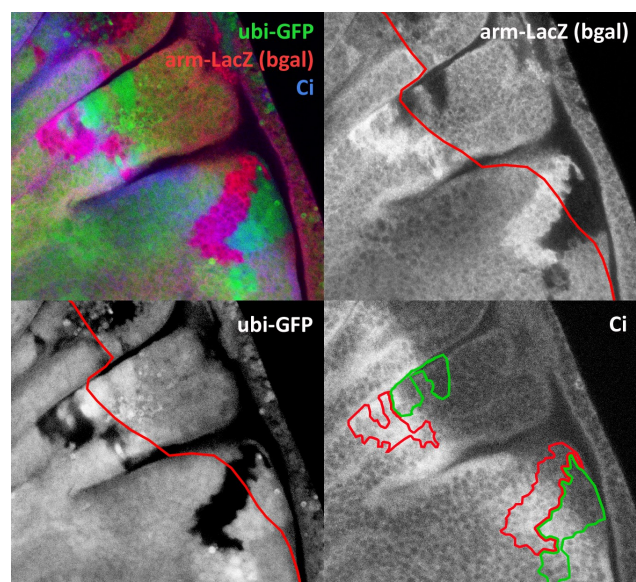


Figura R15. Análisis clonal de la transgresión del borde de compartimentos A/P. La imagen muestra clones gemelos generados 2 días antes de la inducción de apoptosis en el compartimento posterior y tras 2 días de ablación y 2 de recuperación. En la pareja de clones del *hinge* (parte superior) puede verse como una parte del clon 2xGFP está en el compartimento posterior, mientras que su otra parte y su gemelo 2xLacZ están en el compartimento anterior. Esto hace presumible pensar que se originaron en el compartimento anterior, y que con posterioridad una parte del clon 2xGFP accedió al compartimento posterior. La pareja de clones del *notum* (parte inferior) presenta una parte de ambos clones en cada compartimento.

deberíamos ser capaces de encontrar una pareja de clones asilados en los que uno de ellos se encontrara en el compartimento anterior y el otro con una fracción en el anterior y otra en el posterior. Esto aseguraría que la pareja se originó en el compartimento anterior.

Indujimos estos clones 2 días antes de la ablación en un genotipo *ywhsFlp ; UAS-hid tub-Gal80^{TS} / + ; ubi-GFP FRT80B hh-Gal4/arm-LacZ FRT80B*. La observación de los clones la realizamos tras 2 días de ablación y 2 más de recuperación. Como se puede observar en la Figura 15, en efecto pueden encontrarse parejas de clones en las que uno, o incluso los dos clones presentan células en ambos compartimentos. Este resultado confirma, por tanto, la capacidad de las células de transgredir el borde A/P tras la ablación del compartimento posterior.

Fig. 14. Las células pueden cambiar de identidad en la reconstrucción del borde dorso-ventral

Una vez vista la plasticidad de identidad celular existente durante la reconstrucción del compartimento posterior, hemos estudiado si este fenómeno es una particularidad del borde A/P, o por el contrario se trata de un mecanismo más general. Para ello hemos reproducido el mismo esquema de estudio al borde dorso-ventral (D/V), llevando a cabo la ablación del compartimento dorsal mediante la línea *apterous-Gal4* (ver Fig. m2D).

Comparando, tras 48 horas de inducción de expresión, los genotipos *ap-Gal4 UAS-GFP / tub-Gal80^{TS} ; UAS-Flp act>stop>LacZ / +* (control, Fig. r16A) y *ap-Gal4 / UAS-hid tub-Gal80^{TS} ; UAS-Flp act>stop>LacZ / +* (ablación mediante *hid*, Fig. r16B), pudimos ver que en ambos casos el linaje dorsal queda completamente marcado y que en el caso de inducción de *hid* además hay una importante presencia de células apoptóticas y una clara reducción de estos compartimentos dorsales.

Tras 72 horas adicionales de recuperación a 17°C en los discos que sufrieron ablación con *hid*, y de forma análoga a lo encontrado en el compartimento posterior, detectamos la presencia de grupos de células con un origen ventral (que no poseen la marca de β gal del linaje dorsal) localizadas dentro del compartimento dorsal (Fig. r16C-D). Pese a ello la expresión de *wingless*, que tiene lugar donde se enfrentan células de ambos compartimentos, es normal (Fig. r16C), lo que sería indicativo de que, pese a que las células a ambos lados del borde tengan un origen ventral, las células han adquirido una identidad celular dorsal. Hemos visualizado también este cambio de identidad usando la proteína de fusión PS1 α -YFP que marca con fluorescencia la integrina específica del compartimento dorsal PS1 α , codificada por el gen *mew* (*multiple edematous wings*). Como se muestra en la Fig. r16D, las células de origen ventral que forman parte del compartimento dorsal han ganado la expresión de este marcador.

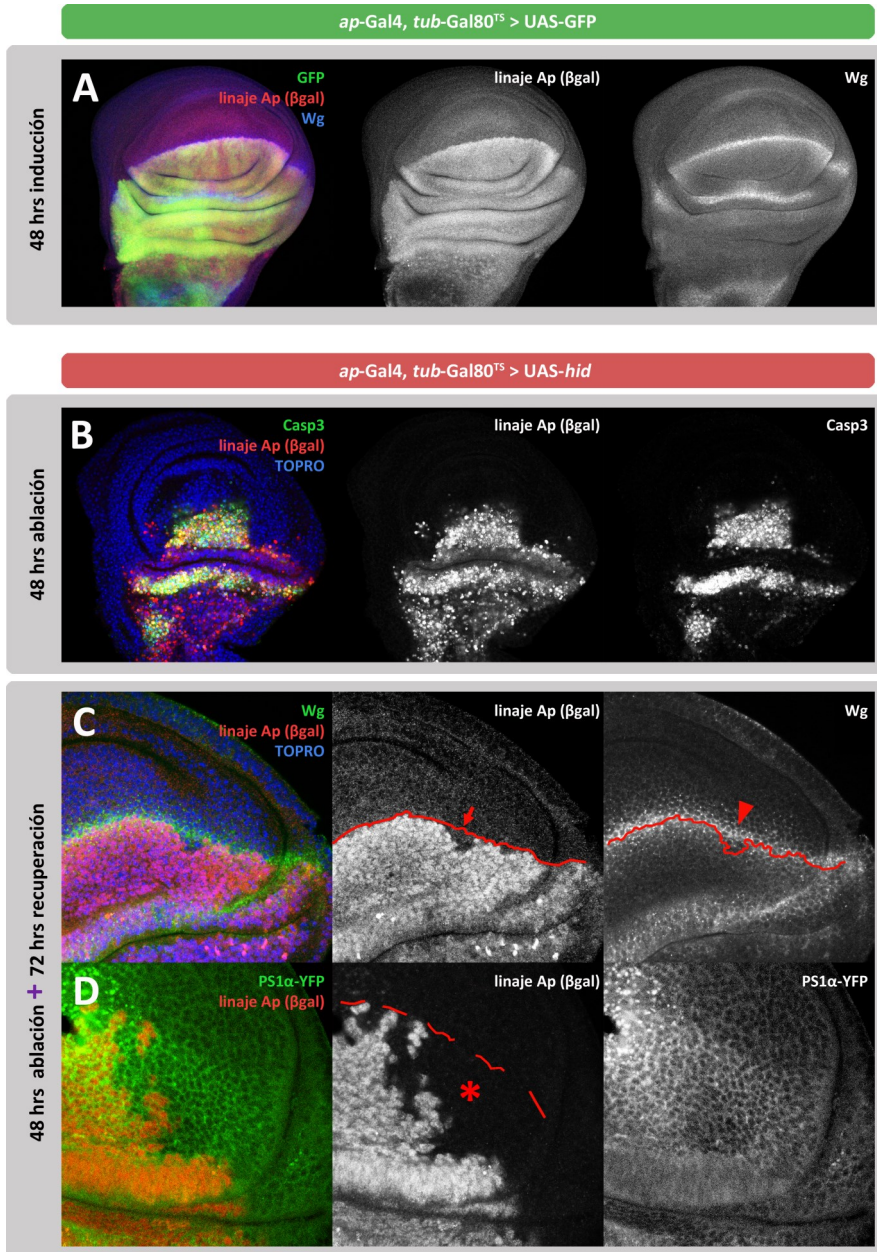


Figura R16. Células de origen ventral pueden participar en la reconstrucción del compartimento dorsal. Discos imaginales de ala de los genotipos *ap-Gal4 UAS-GFP / tub-Gal80^{TS} ; UAS-Flp act>stop>LacZ / +* (control) **(A)** y *ap-Gal4 / UAS-hid tub-Gal80^{TS} ; UAS-Flp act>stop>LacZ / +* (ablación mediante *hid*) **(B-D)**. Tras 48 horas de inducción del Gal4, todas las células del compartimento dorsal adquieren la marca de linaje tanto en un control **(A)** como tras la sobreexpresión de *hid* **(B)**. Nótese la gran cantidad de células apoptóticas y la reducción del tamaño del compartimento dorsal en el segundo caso. Dando a los discos 72 horas adicionales de recuperación, pueden encontrarse células de origen ventral (sin la marca del linaje) que adquieren un marcador propio del compartimento dorsal como la integrina *mew* **(D)** y confrontadas al resto de células ventrales restablecen el borde D/V (visible por la expresión de *wg*) **(C)**. Ambos hechos muestran que han cambiado su identidad de ventral a dorsal.

Al igual que lo mostrado para el borde A/P, en ocasiones también pueden encontrarse células que teniendo un origen dorsal, tras la ablación de este compartimento, cambian su identidad a ventral (datos no mostrados), de lo que se puede deducir que en este borde de compartimentos también tiene lugar un colapso y mezcla de células.

R17. El borde A/P pierde su tensión facilitando que las células de ambos compartimentos se entremezclen

Los bordes de compartimentos en los discos imaginales tienden a ser líneas rectas. Se cree que esta propiedad es fundamental para la morfogénesis, al funcionar los bordes como centros organizadores que deben secretar morfógenos con un patrón espacial estable y nítido (Blair, 2003). Se ha descrito que la alineación de estos bordes es consecuencia de que las diferentes identidades genéticas a un lado y otro del borde conducen a una baja afinidad entre las células. Esto lleva a minimizar la superficie de contacto entre ambos compartimentos con una línea recta (McNeill, 2000). Recientemente, se ha estimado que la adhesión no es suficiente para mantener sin mezclarse 2 poblaciones de células que proliferen activamente y que la fuerza que mantiene los 2 compartimentos separados es una tensión mecánica generada por un cable de acto-miosina (Major and Irvine, 2005; Landsberg et al., 2009).

Como ya observamos anteriormente, tras la ablación del compartimento posterior, el borde del linaje Hh parece presentar interdigitaciones (Fig. r13B). Puesto que durante las transgresiones los bordes de compartimento pueden quedar transitoriamente colapsados, quisimos estudiar con más cuidado la forma del borde A/P, comparando de nuevo los genotipos UAS-GFP / *tub-Gal80^{TS}* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control) y UAS-*hid tub-Gal80^{TS}/+* ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (experimental) tras 48 horas de inducción de expresión. Pudimos encontrar que mientras en los

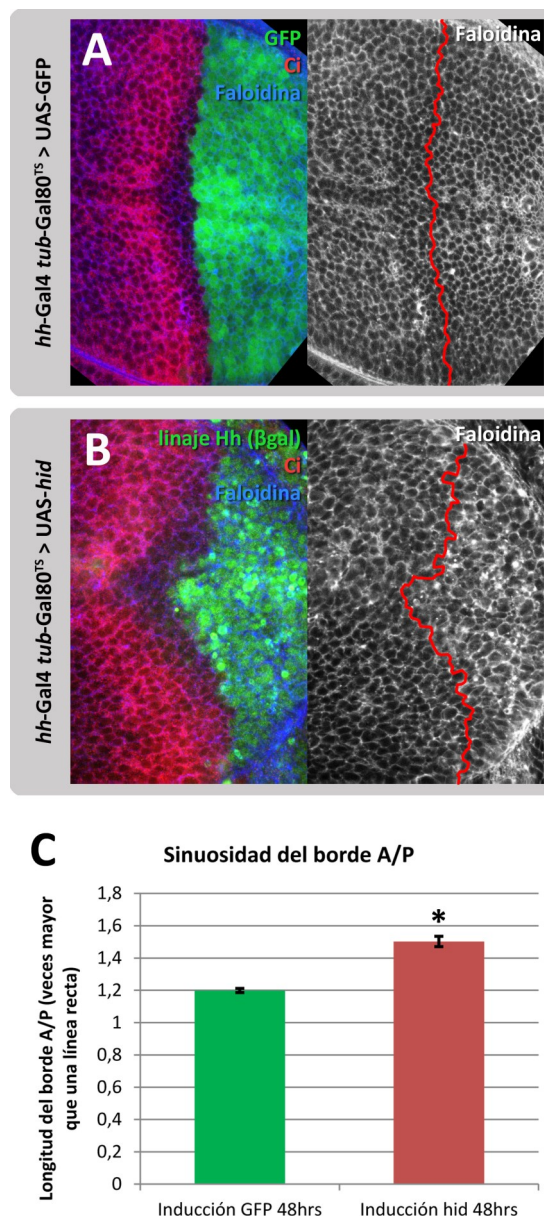


Figura R17. Distensión del borde A/P. (A-B) Bordes de compartimento A/P en un genotipo de sobreexpresión de GFP (A) o *hid* (B) en el compartimento posterior, tras 48 horas de inducción. Nótese que mientras en una situación control este borde es aproximadamente recto dentro del *pouch* del ala, tras una ablación se vuelve distendido y sinuoso. (C) Cuantificación de esta sinuosidad, medida como la longitud real del borde con respecto a una línea recta ideal. Las barras de error representan errores estándar. $*=p<1\times10^{-7}$. $n=14$ en cada genotipo.

controles el borde es esencialmente recto, interactuando cada célula con no más de 1 o 2 células del otro compartimento (Fig. r17A), tras la inducción de *hid* en el compartimento posterior el borde es mucho más irregular y algunas de sus células pueden estar rodeadas por hasta 4 del otro compartimento (Fig. r17B).

Para cuantificar cómo de sinuoso se vuelve el borde A/P, calculamos, dentro del pouch del ala, el aumento de longitud de este borde con respecto a una línea recta ideal. Así, este parámetro equivaldría a 1 en caso de ser una recta perfecta y tendría valores superiores a 1 cuanto más complejo sea el borde. Hemos encontrado que este índice pasa de un valor de 1,2 en los controles de inducción de GFP a 1,5 en las inducciones de *hid*, con una elevadísima significación estadística de $p < 1 \times 10^{-7}$ (Fig. r17C).

Una observación complementaria es que ocasionalmente, como en el disco mostrado en la Figura r14C, no siempre todas las células de una transgresión que por su localización se encuentran dentro del compartimento posterior necesariamente pierden la actividad de *cubitus interruptus* y adquieren la de *engrailed*, como correspondería a la nueva posición que ocupan. Como consecuencia, podemos encontrar “islas” de compartimento anterior dentro del posterior. El que no se re-especifiquen genéticamente todas las células que acceden a otro compartimento apunta a que la distensión y mezcla de células son fenómenos previos (y posiblemente requisitos) para el cambio de identidad genética de las células transgresoras.

7.2. Respuesta proliferativa a la ablación del compartimento posterior

Como se mostró en el apartado R1F, al llevar a cabo una ablación en un dominio abierto como Rn, la respuesta proliferativa del resto del disco imaginal es sistémica e inmediata. No obstante, y pese a la existencia de transgresiones del borde de compartimento, este tipo de respuesta podría no ser aplicable en la ablación de un dominio cerrado, como es un compartimento.

Para estudiar las posibles semejanzas o diferencias, se llevó a cabo un análisis clonal semejante al mostrado para la ablación del dominio Rn. Se indujeron clones neutros, de ganancia del marcador GFP, en los genotipos *hs-Flp; UAS-hid tub-Gal80TS/+; ubiP63E>stop>GFP/+* (controles sin expresión de *hid*) y *hs-Flp; UAS-hid tub-Gal80TS/+ ; hh-Gal4/ ubiP63E>stop>GFP* (inducción de *hid* en el compartimento posterior). En un primer lugar se generaron los clones de forma simultánea al inicio de la inducción de expresión a 29°C, recogiendo los discos al final de una ablación de 48 horas (ver

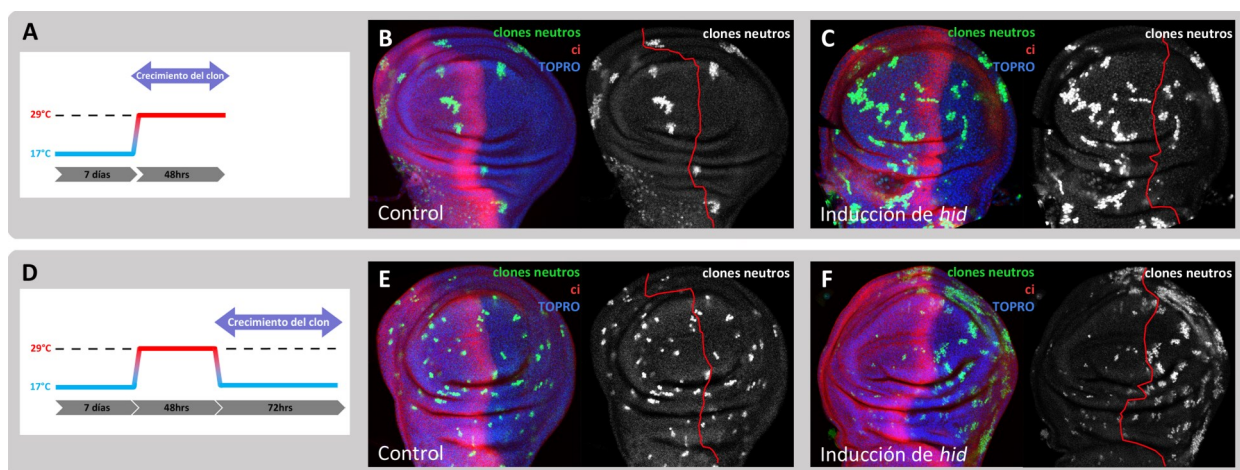


Figura R18. Patrón temporal de proliferación tras la ablación del compartimento posterior. (A-C) Clones neutros de ganancia de GFP inducidos a la vez que la ablación del compartimento posterior y escrutados al final de las 48 horas de ablación (ver diagrama A). Se muestran un disco control (B) y otro tras sobreexpresión de *hid* (C). Nótese que en ambos casos no hay diferencias notorias en el tamaño de los clones entre ambos compartimentos. (D-F) Clones neutros inducidos al final de un periodo de ablación de 48 horas y escrutados tras 72 horas de recuperación (ver diagrama D). Nuevamente se comparan un disco control (E) con otro tras la sobreexpresión de *hid* (F). Obsérvese como en este caso sí que existe una notoria diferencia en el tamaño de los clones entre los dos compartimentos en el caso del disco que sufrió una ablación previa. Estos resultados implican que tiene lugar un incremento de la proliferación, pero que este tiene lugar con posterioridad a la ablación.

diagrama Fig. r18A). El tamaño de estos clones muestra el crecimiento que ocurre de forma simultánea a la ablación. A diferencia de lo hallado para el *pouch*, no se puede apreciar ninguna diferencia en el tamaño de estos clones comparando los del compartimento posterior con los del anterior en ninguno de los 2 genotipos (Fig r18B-C).

Ante la aparente ausencia de proliferación extra durante el periodo de ablación se decidió estudiar un posible aumento en la fase posterior a la ablación. Para ello, se administró el golpe de calor que genera los clones justo al final del periodo de ablación de 48 horas, escrutando el tamaño de estos clones tras 72 horas de recuperación a 17°C (ver diagrama Fig. r18D). Si bien, como es esperable, en los discos control el tamaño de los clones en ambos compartimentos sigue siendo comparable (Fig. r18E), en los que sufrieron una ablación del compartimento posterior existe una muy notoria diferencia en los clones posteriores (Fig. r18F), con un tamaño de 2 a 4 veces superior al de los del compartimento anterior (lo que corresponde a 1 o 2 rondas adicionales de división).

No obstante, en el caso de los clones simultáneos a la ablación, la apoptosis podría estar compensando negativamente un posible incremento en tasa de división, dando una falsa imagen de ausencia de proliferación extra. Por ello, estudiamos el índice mitótico de forma semejante a lo mostrado previamente en la Figura r10. Se compararon tinciones de fosfo-Histona3 (PH3) al final del periodo de inducción de 48 horas de discos control UAS-GFP *tub*-Gal80TS ; *hh*-Gal4 (Fig. r19A) con

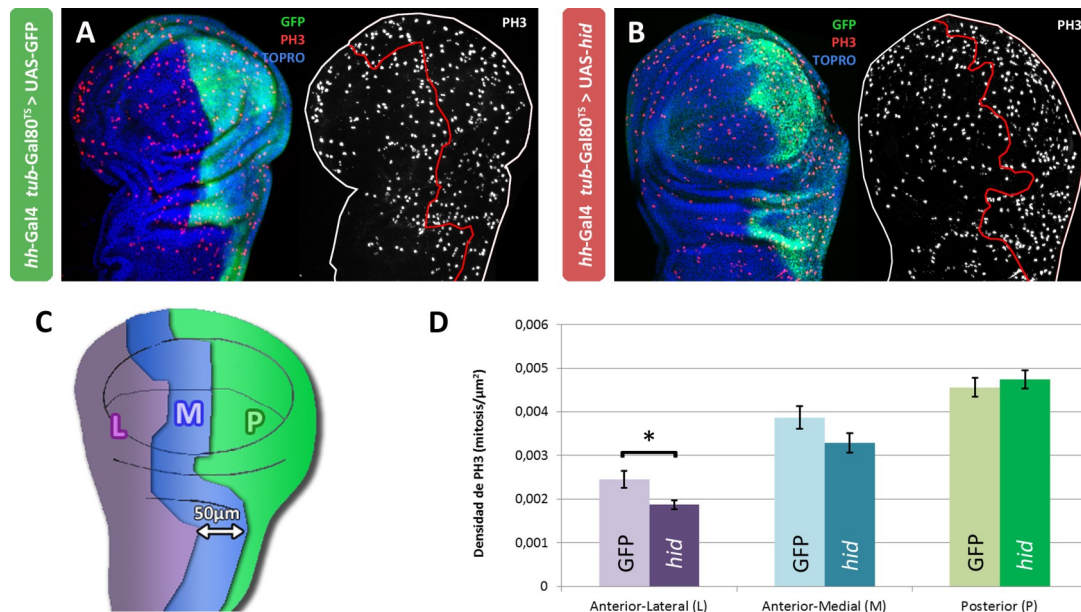


Figura R19. La tasa de proliferación no se modifica mientras tiene lugar la ablación del compartimento posterior. (A-B) Discos de ala tras sobreexpresiones de 48 horas en el compartimento posterior de GFP **(A)** o *hid* **(B)**, teñidos con el marcador de mitosis PH3. Nótese la aparente ausencia de diferencia de este marcador entre ambos genotipos. **(C-D)** Cuantificación de la densidad de PH3 tras la inducción de 48 horas en las tres regiones que se definen (se esquematiza en **C**): el compartimento posterior (“P”), la región medial del compartimento anterior (una banda de 50 μm de ancho, “M”) y la región lateral del compartimento anterior (“L”). Obsérvese como no hay claras diferencias en ninguna de las regiones a excepción de una disminución de la proliferación de apenas un 25% en la región “L”. n=16 en cada genotipo. Las barras de error representan errores estándar. *=p<0,05. n=15 en cada genotipo.

experimentales *UAS-hid tub-Gal80TS ; hh-Gal4* (Fig. r19B). Se delimitaron, de nuevo, 3 regiones de estudio (Fig r19C): el propio compartimento posterior (“P”), una banda de 50μm del compartimento anterior en torno al borde A/P (región medial “M”, que podría estar sometida a señalización local procedente del posterior) y el resto del compartimento anterior (región lateral “L”). Al comparar el número de células en división por unidad de superficie no se encontró ningún incremento en la región P así como en la región M (Fig. r19D).

En cambio sí pudimos encontrar una disminución en el índice mitótico en los discos que sufren ablación, estadísticamente significativa pero menor a nivel cualitativo, en la región lateral del compartimento anterior. En ciertas circunstancias, se ha descrito que la autonomía proliferativa de los compartimentos puede no respetarse, reaccionando un compartimento con una disminución en su crecimiento ante una manipulación de la proliferación del otro compartimento (Garcia-Bellido et al., 1994; Mesquita et al., 2010). Este fenómeno, en ocasiones llamado “efecto de acomodamiento” podría explicar la reducción no autónoma de la proliferación de esta región. No obstante, como se mostró en la Figura r13C el tamaño total del compartimento anterior tras la ablación no se ve alterado,

mostrando que el resultado de la región “L” es irrelevante numéricamente. El caso que tratamos corrobora, al contrario, un fenómeno de autonomía proliferativa de los compartimentos.

Aunque los datos apuntan fuertemente a que no existe un incremento en la proliferación del compartimento posterior simultáneo a la ablación, no podemos descartarlo por completo, por el hecho mencionado de que los clones generados en este periodo no ven reducido su tamaño. Sin embargo, ante el claro aumento que sí hemos detectado en tiempos posteriores mediante el análisis clonal, podemos asegurar que la mayor parte de la proliferación que restituye el compartimento dañado tiene lugar en el periodo de recuperación posterior a la ablación. Además, a diferencia de lo encontrado en el *pouch* del ala, la respuesta proliferativa no es sistémica, sino restringida al compartimento que ha sufrido el daño.

Fig. 22Q. La actividad de los complejos Polycomb y trithorax se modifica en el borde A/P para permitir los cambios de identidad celular

Muchos genes que controlan el desarrollo (los llamados “developmental genes”), como los Hox o los de identidad de compartimento, tras ser activados o reprimidos inicialmente durante la embriogénesis mantienen este estado de activación/represión por acción de los complejos proteicos de los grupos Trithorax y Polycomb, respectivamente (ver Introducción). Dado que nuestros resultados muestran cambios recíprocos en la actividad de genes como *en*, *ci* ó *ap*, nos preguntamos si estos complejos reguladores modifican su actividad en las transgresiones. Para comprobar esta posibilidad hicimos 2 abordajes.

En el primero nos valimos de la línea *psc-QF* (ver Fig. m2F). Nuestra estrategia consistió en que dado que la línea tiene el trans-activador QF insertado en el *locus* del gen del grupo Pc *posterior sex combs*, introduciendo un reportero como QUAS-mtdTomato podríamos estudiar la actividad transcripcional de este gen. Estudiamos el patrón de este reportero en los genotipos UAS-LacZ *tub-Gal80^{TS}* / *psc-QF* QUAS-mtdTomato ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (control de sobreexpresión de LacZ) y en el experimental UAS-*hid tub-Gal80^{TS}* / *psc-QF* QUAS-mtdTomato ; *hh-Gal4/UAS-Flp act>stop>LacZ* (sobreexpresión de *hid*) tras 48 horas de inducción. Como se muestra en la Figura r20A, en una situación control este reportero muestra más actividad a lo largo del borde D/V, pero igual entre compartimentos anterior y posterior y homogéneo a lo largo del eje A/P (a excepción de 1-2 filas de células anteriores en contacto con el borde A/P, donde disminuye). Sin embargo, en el caso de los discos experimentales (Fig. r20B) la actividad transcripcional de *psc* se reduce no sólo en el

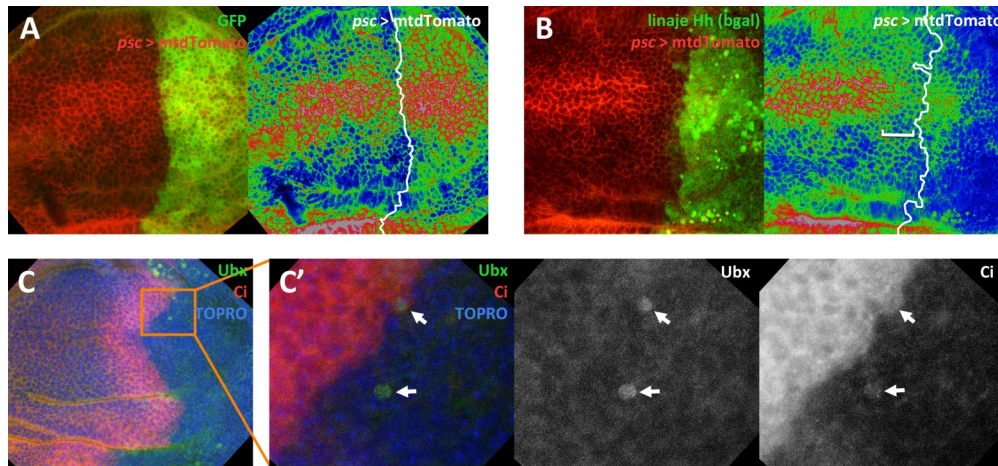


Figura R20. La actividad de las proteínas del grupo Polycomb se modifica en el entorno del borde de compartimentos. (A-B) Actividad transcripcional de gen *psc*, estudiada mediante la inserción *psc*-QF que activa el reportero QUAS-mtdTomato. Se muestran los niveles de actividad, en una escala de pseudo-colores, en un genotipo de sobreexpresión de LacZ (control) **(A)** y de *hid* **(B)** tras 48 horas de inducción. Nótese en **B** la reducción de niveles de mtdTomato no sólo en todo el compartimento posterior sino también en unas 8 filas de células del anterior en contacto con el borde A/P (llave blanca). **(C-C')** Activación en células del compartimento anterior de *Ubx*, que durante el desarrollo normal está reprimido por PcG en el disco de ala. El disco mostrado ha sufrido una ablación con *hid* de 48 horas. Nótese que las dos células positivas para *Ubx* también lo son para *Ci*, indicando que son células del compartimento anterior.

compartimento posterior, sino también en una buena parte de las células anteriores cercanas al borde A/P (ver llave en Fig. r20B).

Como segunda aproximación, nos preguntamos si otros genes que son dianas de los complejos PcG/TrxG durante el desarrollo pueden ser modulados inespecíficamente en el borde de compartimentos. El gen *hox Ultrabithorax (Ubx)* es un ejemplo de gen de identidad celular cuya actividad se mantiene reprimida por los complejos Pc. Durante la embriogénesis, el elemento de respuesta a Polycomb (PRE, en inglés) que posee *Ubx* hace que su expresión sea reprimida en todos los segmentos anteriores al parasegmento 6, y más tarde, durante el crecimiento de los discos imaginales, que haya expresión en el segmento T3 mientras queda reprimida en todo el segmento T2, donde se encuentra el disco imaginal de ala (Schwartz and Pirrotta, 2007; Garaulet et al., 2008). En este disco, únicamente se encuentra expresión de *Ubx* en las células de la membrana peripodial. Nuestra hipótesis es que si tras una ablación del compartimento posterior está disminuyendo la actividad de los complejos PcG, algunas células del borde A/P podrían ganar, quizá de forma transitoria, actividad *Ubx*. Confirmando esta idea, tras una ablación de 48 horas con *hid*, de forma esporádica pueden encontrarse en el mismo borde de compartimentos células de identidad anterior (positivas para *Ci*) que también son positivas para *Ubx* (Fig. r20C). El caso mostrado es, además, una situación extrema en

la que puede observarse una célula con actividad tanto Ci como Ubx que se encuentra ya integrada dentro del compartimento posterior.

Las 2 aproximaciones, en conjunto, apuntan a que existe una modificación en la actividad de los complejos PcG/TrxG inducida no-autónomamente en el compartimento anterior tras la ablación del posterior. Pero para verificar que la actividad de éstos es funcionalmente necesaria para los cambios de identidad que estudiamos, decidimos realizar los experimentos de ablación en fondos mutantes heterocigóticos para los genes *polycomb* (alelo Pc^3) y *trithorax* (alelo trx^{E2}). Si bien estas mutaciones en heterocigosis sólo muestran pérdidas de función parciales para estos genes, pueden ser utilizados como fondos sensibilizados sobre los que se amplifiquen fenotipos que dependan de regulación epigenética (Garaulet et al., 2008). La hipótesis que planteamos es que para que las transgresiones tengan lugar, las células deben alcanzar un estado de menor determinación genética, disminuyendo la actividad PcG y aumentando la TrxG. Por ello, esperamos que en un fondo $Pc^3/+$ el número de transgresiones aumente tras la ablación, mientras que en un fondo $trx^{E2}/+$ disminuya o desaparezca.

Hemos cuantificado estas diferencias midiendo la superficie de las transgresiones (células posteriores no derivadas del linaje Hh que se encuentran justo en el borde A/P). Como se puede observar en las imágenes de la Fig. r21B y r21D y en la gráfica r21E, tras 48 horas de ablación con *hid* y 72 horas de recuperación, el tamaño de las transgresiones aumenta notoriamente (3 veces mayores) en el fondo mutante $Pc^3/+$ respecto al silvestre (Fig. r21B), mientras que se ven muy reducidas (unas 5 veces menores) en el fondo $trx^{E2}/+$ (Fig. r21D).

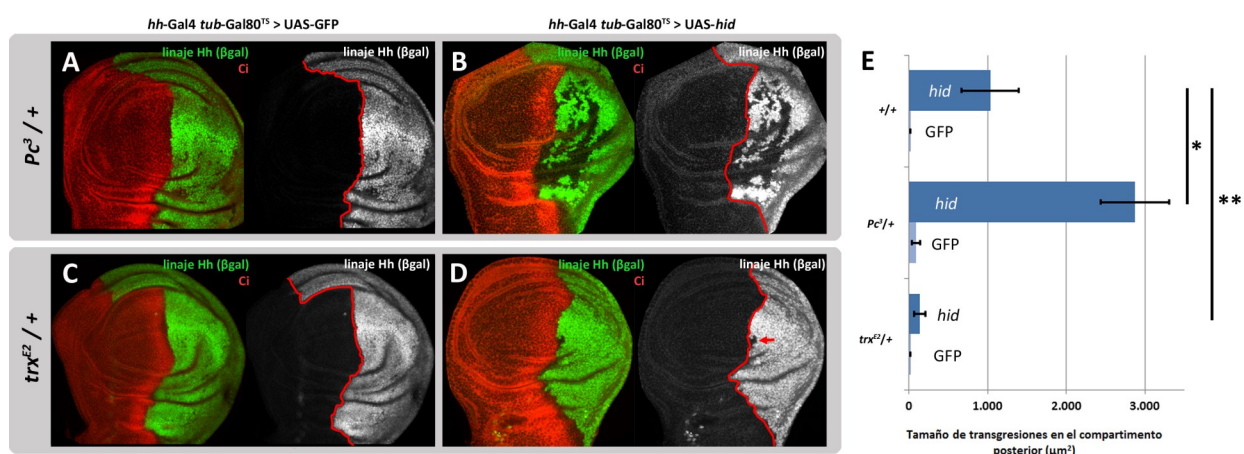


Figura R21. El cambio de la actividad PcG y *trx*-G permite las transgresiones del borde de compartimentos. Discos imaginales de genotipos de sobreexpresión de GFP (A y C) y *hid* (B-D) tras 48 horas de inducción y 72 horas de recuperación en fondos mutantes $Pc^3/+$ (A-B) y $trx^{E2}/+$ (C-D). En el caso de los discos que han sufrido ablación, nótese el incremento del tamaño de las transgresiones en el fondo mutante $Pc^3/+$ (B) y la importante reducción en el $trx^{E2}/+$ (D) (flecha roja). (E) Cuantificación de la superficie de las transgresiones de origen anterior en los genotipos mencionados además de en controles $+/+$. Las barras de error representan errores estándar. * = p < 0,01 ** = p < 0,05. n > 20 en cada genotipo.

Como controles adicionales, repetimos estos experimentos con una inducción de GFP en lugar de *hid*, para comprobar que los fondos mutantes no afectaran a la expresión de la línea *hh*-Gal4 y por tanto a la capacidad de recombinar del *cassette* de marcaje de linaje. Si bien en el fondo mutante *trx^{E2}/+* el linaje del compartimento posterior se sigue marcando en el 100% de las células (Fig. r21C), en el fondo *Pc³/+* algunas de las células no llegan a quedar marcadas (Fig. r21A), si bien el número de estas en el borde de compartimentos, que podrían confundirse con una transgresión, es marginal (ver gráfica r21E).



Los cambios de identidad celular que ocurren tras una ablación pueden ser inducidos de forma no-autónoma

Los cambios de identidad celular son específicos en las transgresiones

La identidad posicional de cada célula en el disco imaginal de ala se determina en función de la concentración de morfógenos difusibles como Wingless y Dpp, que son secretados por las células de los bordes de compartimentos. Gracias a la existencia de estos gradientes, en situaciones como la ablación del *pouch* del ala, la teoría puede explicar que las células que lo repueblan pueden “leer” su posición a lo largo de cada eje y cambiar consecuentemente su identidad celular. Con ello se garantiza que todas las identidades posicionales posibles quedan cubiertas.

Esta explicación, en cambio, no es aplicable a las transgresiones de bordes de compartimentos, y en especial al A/P. Como se explicó en la Introducción, las identidades de compartimento se establecen muy tempranamente en el embrión, y se mantienen únicamente a través del linaje de células de cada

compartimento. Al haber desaparecido el gradiente original *bicoid-nanos* que estableció originalmente estas identidades, no hay posibilidad de que una célula que cambie de localización conozca su nueva posición y cambie de determinación. Esta situación supone un problema conceptual, pues el cuerpo teórico con el que contamos no es capaz de explicar por qué las células de las transgresiones en cambio sí son capaces de adquirir una nueva identidad correcta.

Ante ello proponemos la siguiente hipótesis: que las células de la transgresión obtienen la nueva identidad directamente de las células que la rodean. Creemos que al haberse relajado el borde de compartimentos y haberse entremezclado las células de ambos (ver apartado R2E), una célula con identidad anterior que quede rodeada de células posteriores podrá tomar la identidad de las células que ahora la rodean. Sin embargo, ningún mecanismo así está descrito e implicaría que durante el desarrollo de un organismo las decisiones de identidad se pueden tomar de forma no-autónoma si una mayoría de células cercanas la inducen.

Para poner a prueba esta hipótesis, hemos llevado a cabo un abordaje experimental que consiste en generar grupos de células con una identidad determinada, rodeadas de una mayoría de células con una identidad diferente. Esta idea puede recordar a experimentos convencionales de inducción de clones de ganancia o de pérdida de función de un gen en un fondo de células silvestres. Este tipo de experimentos realizados, por ejemplo, con *engrailed*, jamás han mostrado lo que proponemos: lejos de ello, los clones son rechazados por el entorno (adquiriendo una forma redondeada) e incluso migran hasta el compartimento opuesto, que sí posee su misma identidad (McNeill, 2000; Blair, 2003). En otros contextos, estos clones de identidad diferente incluso son eliminados por competición celular (Milan et al., 2002). Sin embargo, estos experimentos no pueden responder a la hipótesis propuesta, pues en ellos al clon generado se le impone genéticamente una nueva identidad que no puede revertir. Es por ello que en nuestro abordaje no generaremos clones de una nueva identidad en un fondo silvestre, sino clones silvestres en un fondo con la identidad celular modificada. Nuestro objeto de estudio serán las células silvestres, que podrán modificar la actividad endógena de sus genes de identidad.

Hemos llevado a cabo dos abordajes experimentales diferentes para demostrar lo expuesto. En el primero hemos inducido clones de ganancia de función mediante del sistema Gal4/UAS a muy alta densidad, de forma que la mayor parte del disco imaginal esté compuesto por células que sobreexpresan un gen de identidad, quedando las silvestres en minoría. En el segundo abordaje hemos aplicado nuevas herramientas genéticas que permiten generar clones de ganancia de Gal80 en un

entorno de sobreexpresión mediada por Gal4/UAS, o dicho de otra forma, clones silvestres en un fondo de sobreexpresión de genes de identidad (ver detalles en Materiales y Métodos).

El gen de identidad *engrailed* puede ser inducido de forma no autónoma

Para el problema de cómo *engrailed* puede ser adquirido *de novo*, como en las células de origen anterior que transgreden el borde A/P, hemos aplicado el primero de los abordajes mencionados en el apartado anterior. Para ello, en un genotipo *ywhsFlp ; act>stop>Gal4 UAS-GFP / en-LacZ UAS-en* generamos clones 48 horas antes de la formación del pupario y observamos los resultados en larvas pre-pupales. En este genotipo, el territorio de sobreexpresión de *en* queda marcado también por GFP, y de forma simultánea la línea *en-lacZ* permite visualizar los niveles endógenos de expresión de *en*.

Mediante un golpe de calor corto, de 10 minutos, generamos situaciones de baja densidad de clones. En estos casos, en las células circundantes a los clones no encontramos ni activación del elemento *en-LacZ* (Fig. r23A-A') ni presencia de la proteína Engrailed (datos no mostrados). Puede comprobarse en la figura que, en efecto, estamos sobreexpresando *en*, pues en el compartimento posterior dentro de estos clones la dosis del gen exógeno está reprimiendo la actividad del gen endógeno, tal como está descrito (Guillen et al., 1995; Tabata et al., 1995).

Sin embargo, con golpes de calor largos, de 30 minutos, en los que se satura el disco de clones, pudimos encontrar que en el compartimento anterior (donde nunca se activa el reportero *en-LacZ*, ver Fig. r23C) en las inmediaciones del territorio que sobreexpresa *en* (positivo para GFP) tiene lugar una activación no-autónoma del *en* endógeno (Fig. r23B-B''). Esta actividad de la construcción *en-LacZ* es muy notoria en el *hinge* y el *notum* (Fig. r23B'') aunque también es detectable en el *pouch* (Fig. r23B'). Este aumento local de la transcripción de *en* se corresponde con la presencia de la proteína que codifica (datos no mostrados) y con una disminución de la proteína Cubitus interruptus (ver cabezas de flecha rojas), lo que indica que estas células están cambiando su identidad de anterior a posterior como efecto de la presencia de los clones UAS-*en* en las cercanías.

Este resultado podría entenderse no como un genuino cambio de identidad celular sino como una manifestación de un efecto descrito, por el cual el compartimento posterior, al secretar el factor difusible Hedgehog, induce en las células inmediatamente en contacto la expresión de nuevo *engrailed* (al ser *en* una diana a muy altos niveles de Hh) (Blair, 1992; Hidalgo, 1994), si bien estas células siguen siendo de identidad anterior y no reprimen *ci*. Así, al generar nuevos bordes de compartimento con los clones se justificaría esta activación. Sin embargo, hemos comprobado que este efecto, que sí se

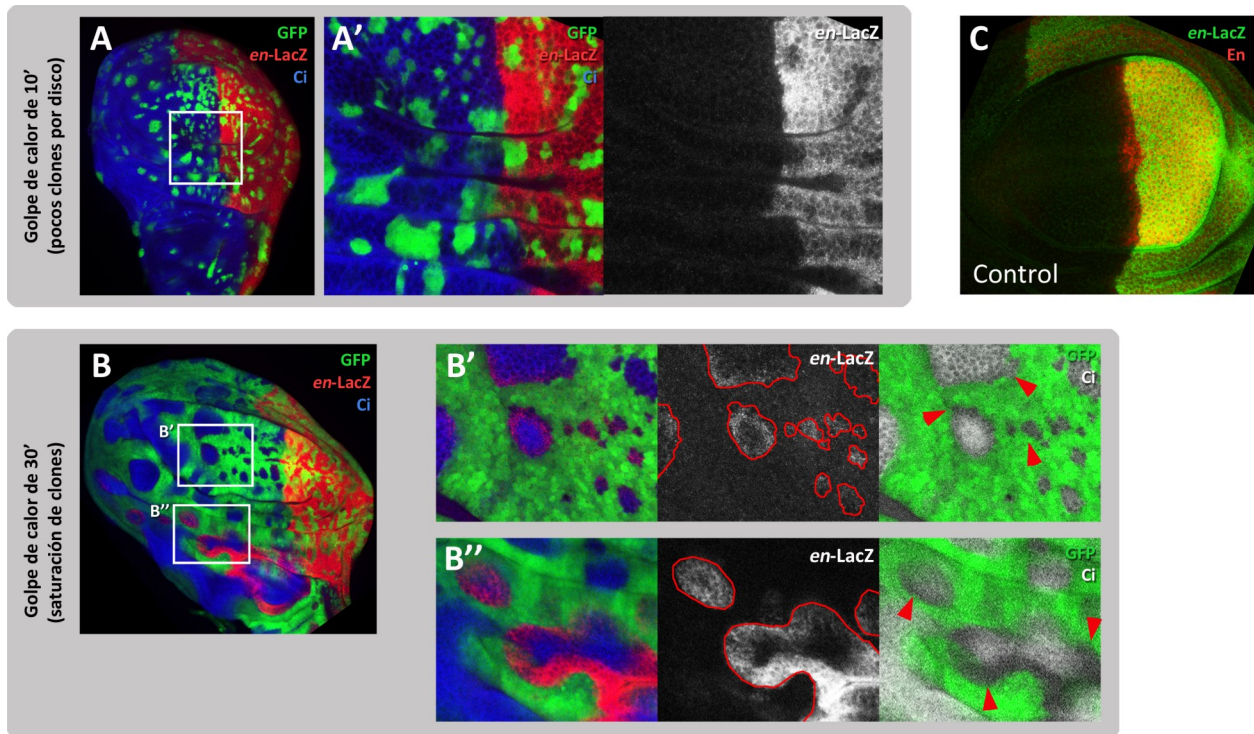


Figura R22. El gen de identidad posterior *engrailed* puede inducirse de forma no autónoma. (A-B'') Clones de sobreexpresión de *en* y GFP generados 48 horas antes de la formación del pupario. **(A-A')** Al ser inducidos a baja densidad (mediante un golpe de calor corto) no se observa en el compartimento anterior ningún efecto sobre la actividad endógena del propio gen *engrailed* (detectable por la construcción *en-LacZ*), ni dentro de los clones ni fuera de estos. **(B-B'')** Sin embargo, al saturarse el disco imaginal de estos clones, de forma que el territorio silvestre queda reducido a parches, se observa que en las células en contacto con el territorio que sobreexpresa *en* (positivo para GFP) tiene lugar una activación de la construcción *en-LacZ*. El incremento de la transcripción de *en* se corresponde además con una disminución de la actividad del gen de identidad anterior *Ci* (cabezas de flecha en los paneles derechos de **B** y **B''**), lo que sugiere que estas células están cambiando su identidad de anterior a posterior. El efecto es muy notorio en el *hinge* y el *notum* (**B''**), si bien también está presente en el *pouch* (**B'**). **(C)** Comparación en un disco silvestre entre la actividad del reportero *en-LacZ*, limitado al compartimento posterior, y la presencia de la proteína En, que como está descrito se detecta también en unas pocas células del compartimento anterior.

visualiza en un disco silvestre con un anticuerpo contra En, no tiene reflejo en la línea *en-LacZ*, que sí respeta el borde de compartimentos (Fig. r23C). Además, nuestro caso es distinto de este efecto, pues no se manifiesta a baja densidad de clones y además encontramos una represión de *ci*. Estos hechos nos hacen creer que lo observado representa verdaderas activaciones no-autónomas de *engrailed* y cambios de identidad celular cuando la mayor parte del tejido anterior cambia su identidad a posterior.

Un fenómeno similar ya había sido encontrado en un trabajo previo al sobreexpresar *en* mediante la línea *ap-Gal4*, encontrándose una activación del gen endógeno en las células del borde D/V del lado ventral, si bien en su momento no se pudo dar una explicación clara a este resultado (Garaulet et al., 2008). Creemos que lo encontrado en dicho estudio responde al mismo fenómeno que tratamos aquí.

Fig. R23. El gen *Ultrabithorax* también puede ser inducido de forma no autónoma

Ante esta inesperada capacidad de *engrailed* de ser inducido de forma no autónoma hemos querido saber si es una peculiaridad de este gen o mas bien se trata de un mecanismo general presente en genes de identidad y no descrito hasta el momento. Para ello hemos utilizado como modelo al gen Hox *Ultrabithorax*.

En primer lugar repetimos el mismo abordaje del apartado anterior: generar clones de ganancia de *Ubx* a alta densidad en el disco de ala (donde nunca se expresa este gen, a excepción de la membrana peripodial) y estudiar su posible activación inducida en el tejido silvestre restante. Generamos clones 48 horas antes de la pupación en un genotipo *ywhsFlp; act>stop>Gal4 UAS-GFP / UAS-Ubx*. De forma sorprendente, pudimos encontrar presencia de la proteína *Ubx* no sólo en células pertenecientes a los clones (positivas también para GFP), sino también en algunas células en contacto con estos clones (Fig. R23A), si bien el fenómeno no es tan profuso como lo visto en las sobreexpresiones de *engrailed* anteriores.

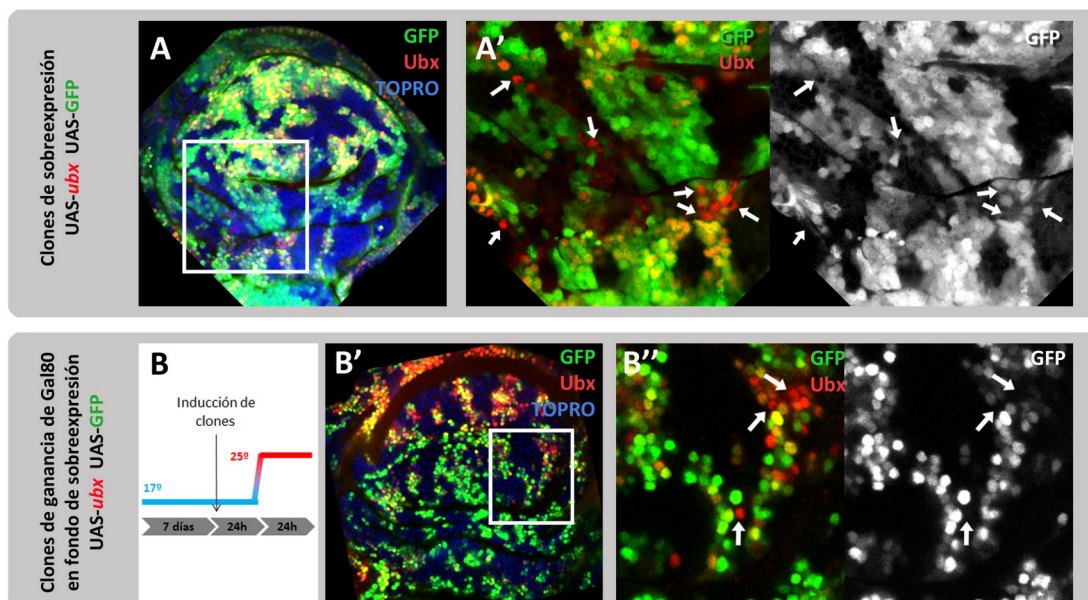


Figura R23. El gen de identidad posterior *ultrabithorax* puede inducirse de forma no autónoma. (A-A')

Clones de sobreexpresión de *Ubx* y GFP generados 48 horas antes de la formación del pupario en el disco de ala. Nótese en las inmediaciones de los clones (marcados por GFP) la presencia de células positivas para *Ubx* que no forman parte clones (flechas). **(B-B'')** Disco de ala con clones de activación de Gal80 en un fondo de sobreexpresión ubicua de *Ubx* y GFP. Se indujo la expresión de estos transgenes 24 horas antes de la pupación, mientras que los clones de Gal80 se generaron 48 horas antes de la pupación (ver diagrama B). Obsérvese la presencia de proteína *Ubx* (flechas) en células del borde de los clones, marcados por ausencia de GFP **(B'-B'')**.

Quisimos corroborar este resultado mediante un segundo abordaje experimental. Decidimos aplicar una puerta lógica “A NOT HS” (ver materiales y métodos), con la que podemos sobreexpresar *Ubx* de forma ubicua a excepción de en clones que previamente han adquirido Gal80, y por tanto son refractarios a la actividad Gal4. Está descrito para *Ubx* un mecanismo de retroalimentación positiva por la que el gen es activado por el propio producto proteico en el mesodermo visceral (Bienz and Tremml, 1988). Este fenómeno, de darse también por una sobreexpresión transitoria de la construcción UAS-*Ubx* en las células del clon, daría un resultado falsamente positivo. Por ello decidimos inducir estos clones *tubP>stop>Gal80* 24 horas antes de la inducción de expresión a 29°C, para que la proteína Gal80 esté presente y bloquee cualquier actividad Gal4 en los clones. Indujimos la expresión del UAS-*Ubx* durante 24 horas y analizamos los discos imaginales resultantes (ver esquema de cambios de temperatura en la Fig. r23B). De nuevo, pudimos encontrar la presencia de proteína Ubx en células no positivas para GFP, en contacto con estas, y que por tanto corresponden a los clones de ganancia de Gal80 (las células silvestres) (Fig. r23B'-B''). Ambos resultados muestran que *Ubx*, al igual que *en*, puede ser activado de forma no autónoma en células que se encuentran rodeadas por otras células que expresan el gen.

Sin embargo, aunque estamos observando un cambio de identidad, no podemos descartar que en realidad la proteína Ubx proceda de las células que la sobreexpresan y haya sido transducida al núcleo de las silvestres. Por ello, deben hacerse experimentos que demuestren que hay una activación del gen Ubx endógeno en estas células al igual que vimos para *engrailed*.

4. discusión

En esta tesis doctoral hemos empleado el gen pro-apoptótico *hid* para inducir daño masivo en diferentes dominios del disco imaginal de ala. El objetivo de estos experimentos ha sido estudiar la respuesta de los discos al daño y su capacidad para reconstruir los dominios dañados. Hemos dividido los dominios sobre los que hemos producido el daño en dos categorías: a) dominios de linaje abierto, donde no existen restricciones durante el desarrollo normal a que células ajenas accedan, y sobre los que hemos estudiado las características de la respuesta homeostática; b) dominios de linaje cerrado, en concreto los compartimentos posterior y dorsal del disco de ala, donde durante el desarrollo normal no existe intercambio de células, y que hemos planteado como modelo de adquisición de pluripotencia durante la regeneración.

41. EN DOMINIOS DE LINAJE ABIERTO LA INDUCCIÓN DE MUERTE MASIVA PROVOCA UNA RESPUESTA HOMEOSTÁTICA INMEDIATA QUE MANTIENE LA INTEGRIDAD DEL EPITELIO

Llevando a cabo la ablación de los dominios de linaje abierto Rotund o Spalt hemos encontrado que simultáneo al proceso de extrusión basal de células apoptóticas, que empieza a ser visible a las 16 horas tras la inducción del gen pro-apoptótico, tiene lugar una migración de células de las regiones colindantes por la cara apical del epitelio (Fig. r4), de forma análoga a lo observado para dominios de menor extensión (Bergantinos et al., 2010a). Este fenómeno permite que al final de un periodo de ablación de 48 horas la inmensa mayoría del dominio haya sido remplazado por estas células, que forman una fina capa que asegura la continuidad e integridad del epitelio (Fig. r4J). Hemos confirmado el origen, exterior al dominio *rn*, de estas células mediante el marcaje de linaje: a) del propio dominio Rn (Figs. r4 y r6); y b) de un dominio periférico, GH146 (Fig. r9).

La incorporación de estas células permite que el dominio mantenga un desarrollo normal. Esto queda de manifiesto al examinar la morfología del dominio y el patrón de expresión de los genes de identidad del *pouch* del ala *nubbin* y *rotund*, que está activos en estas células al final del periodo de ablación de 48 horas (Fig. r5). Ello demuestra que las células que acceden al *pouch* adquieren inmediatamente la identidad correcta de esta región.

Nuestros experimentos, en definitiva, muestran la existencia de una potente capacidad de homeostasis inmediata de los discos imaginales que garantiza la integridad del epitelio, gracias a que las células pueden migrar y adquirir la identidad posicional del territorio dañado.

42. LOS CAMBIOS COLECTIVOS DE IDENTIDAD CELULAR PERMITEN LA RECONSTRUCCIÓN DE ESTRUCTURAS PERDIDAS

Tras un daño producido en un tejido, la respuesta del circundante puede variar desde la cicatrización, en la que se cierra la herida secretando matriz extracelular pero no se recupera completamente la funcionalidad de la estructura dañada, hasta la completa regeneración, en la que las estructuras eliminadas son remplazadas por células nuevas, derivadas del tejido circundante. Para que esto último tenga lugar, no es suficiente con que nuevas células ocupen las posiciones que quedaron vacías: las células deben adoptar el estado de diferenciación y la funcionalidad de las que están

remplazando. Tradicionalmente se ha considerado que el blastema lo componen bien células madre u otras células especializadas que son reclutadas (Jiang and Edgar, 2011; Baguña, 2012) o bien células de tejidos cercanos que se desdiferencian y adquieren pluripotencia (Slack, 2003; Bergantinos et al., 2010b). En el último mecanismo, el modelo del ajolote es paradigmático. Sin embargo, experimentos recientes han mostrado que durante la regeneración de sus apéndices, en realidad las células mantienen su memoria y estado de diferenciación, de forma que el blastema lo forman células de múltiples orígenes que no cambian su identidad celular (Kragl et al., 2009).

Los discos imaginales, si bien son tejidos en crecimiento no diferenciados, sus células sí presentan un grado elevado de determinación genética y su capacidad de transdeterminación en sistemas de discos en cultivo ha atraído la atención de los estudios sobre cambios de identidad durante regeneración (Hadorn, 1965; Hadorn, 1968; Schubiger, 1971). El borde entre los compartimentos anterior y posterior ha sido un caso especialmente estudiado, por cuanto impone muy tempranamente la separación, dentro de una misma estructura, de dos poblaciones de células con diferente determinación genética cuyas poblaciones nunca se mezclan. Incluso otorgando una ventaja proliferativa a las células de uno de los compartimentos no se encuentra el paso de células de un compartimento a otro sino que, sencillamente, el compartimento rápido “empuja” el borde A/P (Brower et al., 1981).

Un estudio clásico (Szabad et al., 1979) mostró, mediante análisis clonales en discos cortados y en discos que sufren ablación genética, que en situaciones extremas el borde A/P puede volverse “laxo” y cambiar las células de identidad. Sin embargo, este resultado ha sido poco tenido en cuenta puesto que los clones contaban con una ventaja proliferativa, y en un contexto silvestre esto podría no suceder. A día de hoy se acepta que los compartimentos son unidades independientes de regeneración (Bergantinos et al., 2010b; Worley et al., 2012) en base a 3 argumentos: i) tras una ablación genética, la identidades anterior y posterior nunca se pierden (Smith-Bolton et al., 2009); ii) la inducción de muerte dentro del compartimento anterior no lleva a un incremento de la proliferación en el posterior (Bergantinos et al., 2010a); iii) tras cortes quirúrgicos dentro del compartimento ventral, las células de origen dorsal no contribuyen a la reconstrucción (Bosch et al., 2008).

En esta tesis, mediante análisis de linaje y clonales rigurosos, hemos sido capaces de encontrar que las identidades de compartimento pueden ser reprogramadas tras la ablación genética de un compartimento entero. Este fenómeno se manifiesta tanto en el borde A/P (Figs. r14 y r15) como en el D/V (Fig. r16), y el proceso es mediado por la modulación de las actividades PcG/TrxG (Figs. r20 y r21). Creemos que los estudios antes mencionados han pasado por alto este fenómeno, y nuestros

resultados en realidad no los contradicen, pues: i) las identidades de compartimento no llegan a desaparecer en ningún momento, si bien se observan células con ambas identidades, realizando la transición (Fig. r14E); ii) las células del compartimento no dañado no aumentan su proliferación, en concordancia a lo descrito, aunque es probable que sí lo hagan tras ingresar en el compartimento dañado; iii) la respuesta tras una ablación quirúrgica puede no ser equivalente a una ablación genética, y además este fenómeno puede depender del tamaño de tejido eliminado, posiblemente no equivalente al tratamiento que nosotros realizamos.

El fenómeno de cambio de identidad mediado por supresión de genes PcG ha sido descrito durante la transdeterminación de discos imaginales (Lee et al., 2005), donde la ruta JNK es la responsable de inhibir los genes PcG. No obstante, este estudio se realizó en discos cultivados *ex vivo*. El nuestro es el primer trabajo que muestra el papel de estos complejos en reconstrucciones *in vivo*. Es además el primer estudio del papel de los complejos TrxG en regeneración de *Drosophila*.

Además de las rutas moleculares mencionadas, creemos también que el fenómeno de distensión del borde de compartimentos y consecuente entremezclado de células (Fig. r.17) es un requisito para que se produzca el cambio de identidad. Nos basamos en 3 hechos:

- a) Las células que cambian de determinación genética se encuentran en el borde de compartimentos, rodeadas por varias células del compartimento dañado (Fig. r14E), o incluso ya han ingresado en este compartimento (Fig. r20C).
- b) No todas las células que forman una transgresión terminan llevando a cabo el cambio de identidad, pudiendo encontrarse tras la reconstrucción parches de un compartimento dentro de otro (Fig. r14C).
- c) Hemos descubierto, creando artificialmente situaciones en las que una célula silvestre se encuentra rodeada de células de otra identidad, que la expresión de genes de identidad como *engrailed* o *Ultrabithorax* pueden ser inducidos forma no-autónoma (ver sección R3).

Por ello proponemos el siguiente modelo de cambio de identidad celular (ver Figura d1). En una situación normal, la falta de afinidad entre células de compartimentos diferentes y la tensión del cable de acto-miosina hacen que, en el borde de compartimentos, cada célula interactúe con un máximo de 1 o 2 células del compartimento opuesto (Fig. d1A). Tras la ablación de un compartimento, tiene lugar una distensión del borde y movimientos celulares que llevan formar interdigitaciones (Fig. d1B). Esta nueva situación provoca que muchas células queden ahora rodeadas por una mayoría de células del

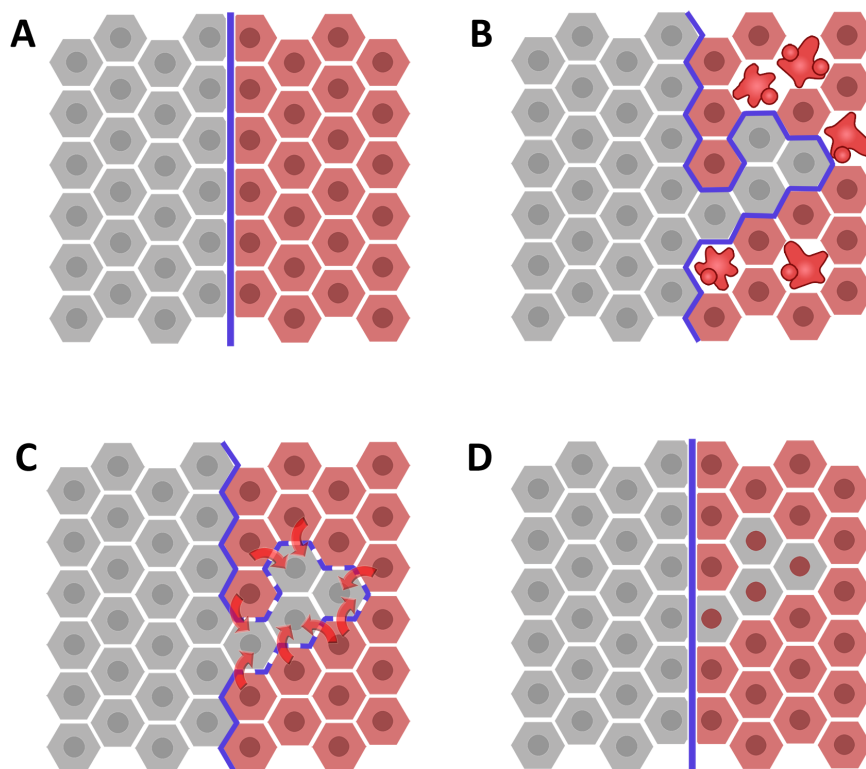


Figura D1. Modelo propuesto para el mecanismo de cambio de identidad de las transgresiones . (A) En una situación normal las células en el borde entre dos compartimentos se disponen de tal forma que minimizan el número de contactos con las células del otro compartimento, tendiendo a ser el borde una línea recta (línea azul). (B) Tras el daño producido en uno de los compartimentos (células estrelladas en el diagrama) se producen movimientos celulares que llevan a las células a entremezclarse y a una alteración de la forma del borde. (C) Las células que quedan dentro de la transgresión, al estar rodeadas de un número mayor de células del compartimento opuesto sufren, por parte de las últimas, un fenómeno de inducción no-autónomo de identidad (flechas rojas). (D) Las células de la transgresión cambian su identidad a la del nuevo compartimento al que pertenecen, reestableciéndose el borde A/P en otra posición.

compartimento opuesto, lo que desencadenaría un fenómeno similar al observado en el apartado R3, en el que las células con la identidad mayoritaria en ese entorno local inducirían su identidad a las células de la transgresión (Fig. d1C). Este cambio sería mediado por una disminución de la actividad de los complejos PcG y un aumento de los TrxG. En los experimentos de clones de ganancia de *en* observamos que este cambio tenía lugar solo en situaciones de mayoría de células con una identidad diferente, pero a nivel del disco entero y no a un nivel local. No obstante, es probable que durante la reconstrucción de compartimentos algún tipo de señalización previa haya sensibilizado a las células para desencadenar el cambio, y la bajada transcripcional de *psc* observada en todo el borde de compartimentos apunta a ello. Con todo ello, las células re-especificarían su identidad a su nueva posición y el borde de compartimentos quedaría restablecido sin necesidad de que, a nivel de tejido, los compartimentos desaparezcan y el borde colapse (aunque esto podría ocurrir a un nivel muy local) (Fig. d1D).

El descubrimiento de estos cambios de identidad en el borde de compartimentos, junto al fenómeno de inducción de identidad no-autónoma, en definitiva implica la existencia de una fuerte plasticidad en la homeostasis y regeneración de los discos imaginales. Por ello creemos que los bordes

de compartimentos en *Drosophila* pueden ser modelos perfectos para el estudio de la adquisición de pluripotencia en blastemas de organismos que regeneran.

Nuestros resultados ponen además de manifiesto la existencia de un fenómeno más general del desarrollo de *Drosophila* por el que las decisiones de identidad celular pueden tomarse de forma colectiva, alcanzándose de alguna forma “consensos” entre células a nivel local. Esta idea está apoyada por los estudios clásicos de transdeterminación de discos imaginales, donde el cambio de identidad de las células a una identidad de otro disco no lo realiza nunca una célula individual, sino que se lleva a cabo por un grupo de hasta 5 células que “fundan” el nuevo territorio (Gehring, 1967; Abbott et al., 1981).

Solo están descritos hasta el momento 2 casos en el desarrollo de *Drosophila* en los que tienen lugar cambios de identidad de compartimento: los espiráculos posteriores del embrión, donde *Abdominal-B* induce la adquisición de *en* por células del compartimento anterior (Merabet et al., 2005) y el *leading edge* del cierre dorsal del embrión, donde una célula de cada parasegmento pasa del compartimento anterior al posterior, adquiriendo expresión de *en* (Gettings et al., 2010). Desconocemos si durante el desarrollo tienen lugar más ejemplos de cambios de identidad y si el fenómeno de inducción no-autónoma que describimos es el responsable, pero nuestros experimentos aportan un posible mecanismo celular que los explique. El fenómeno también podría ayudar a explicar cómo las células del embrión adquieren sus identidades, pues podría ser utilizado para reforzar, dentro de la población de células que fundan un compartimento o estructura, la decisión de determinación celular. En cualquier caso, queda por conocer cuál es el mecanismo molecular de comunicación entre células que está involucrado en este fenómeno.

4.3. RESPUESTA PROLIFERATIVA Y CONTROL DEL TAMAÑO

Se asume que durante la regeneración epimórfica existen dos estrategias para restaurar la población de células: la proliferación asociada a blastema, de carácter local, que tiene lugar ante amputaciones o ablaciones locales, y la proliferación compensatoria, con una distribución más general, ante un evento de muerte celular dispersa por el tejido (Bergantinos et al., 2010b; Worley et al., 2012). Nuestros experimentos, pese a suponer también una inducción de muerte local, han mostrado una respuesta proliferativa muy diferente de la encontrada previamente mediante ablaciones genéticas. Uno de estos estudios encontró una parada general de la proliferación en el disco imaginal a excepción

del propio dominio eliminado, que sigue proliferando a un ritmo silvestre (Smith-Bolton et al., 2009). Otra aproximación reveló un aumento inicial del ritmo de división en las inmediaciones de la ablación y que se extiende en fases posteriores. En general, estos resultados son similares a las respuestas proliferativas locales provocadas tras amputaciones (Bosch et al., 2008).

Mediante cuantificación del número de células en fase M del ciclo celular (Fig. r10) y medición del tamaño de clones (Fig. r11) hemos mostrado que, tras una ablación mediada por sobreexpresión de *hid*, en el *pouch* del ala tiene lugar un aumento de la proliferación con 2 características: a) es inmediato y simultáneo al proceso de ablación y b) tiene un carácter sistémico, respondiendo todas las regiones del disco. Como también mostramos, es probable que unida a esta respuesta sistémica temprana exista en paralelo alguna respuesta local, dado que encontramos que en fases más tardías solo el *pouch* sigue proliferando.

No obstante, creemos que este segundo componente no es cualitativamente relevante por el argumento que sigue. Estimamos que tras 48 horas de inducción el 100% de las células del dominio Rn son eliminadas (y posiblemente también una parte de las primeras células exteriores al *pouch* que lo repueblan) (Fig. r3), representando este dominio el 40% de las células del disco imaginal. Para que el 60% restante restaurara la población original bastaría con menos de un ciclo de división adicional en cada célula. Durante la primera mitad del estadio 3 larvario (que corresponde a las primeras 24 horas de ablación) tienen lugar 2'5 divisiones celulares (Martin et al., 2009), y hemos visto que en las primeras 24 horas de ablación existe un aumento homogéneo de la proliferación de alrededor del 50% (Fig. r10), lo que supone 1'25 divisiones más de lo normal: justo la división adicional que haría falta para restaurar el *pouch*. Podemos analizarlo con otro dato: el que los clones neutros sean de tamaño doble en todo el disco (Fig. r11) implica que todas las células del disco han sufrido una duplicación extra, de nuevo lo necesario para reconstruir el *pouch*.

A diferencia de las respuestas de blastema local, al distribuirse la reacción proliferativa por todo el disco, la contribución relativa de cada célula es fácilmente asumible dentro de su programa de proliferación. Esto nos hace creer que la respuesta que estamos encontrando en el disco en realidad es una homeostasis ante una “injerencia” en su desarrollo. El programa proliferativo del disco imaginal de ala consiste en 9 divisiones celulares que siguen una curva logística (de forma que se ralentizan los ciclos según se acerca a su tamaño final) (Madhavan and A., 1977; Martin et al., 2009). Puesto que el disco parece medir su número de células en cada momento y ajustar su ritmo proliferativo en consecuencia (Martin et al., 2009; Morata and Herrera, 2010), es bastante probable que ante la ablación que provocamos sea suficiente con que el disco retorne a un punto anterior de su desarrollo,

sin necesidad de un programa proliferativo específico del proceso de regeneración. Este tipo de respuesta se asemeja más a cómo se entiende la proliferación compensatoria (Perez-Garijo et al., 2009; Worley et al., 2012).

Este hecho hace plantearnos si entonces es necesaria una señalización específica por parte de las células que son eliminadas para la proliferación del resto del disco. A diferencia de la dependencia de Wingless, dMyc y de la vía de Hippo de otros sistemas de regeneración (Smith-Bolton et al., 2009; Sun and Irvine, 2011), en las ablaciones mediadas por Hid no parece ser necesaria señalización de estos 3 factores ni de Dpp (datos pendientes de publicación de Raquel Martín). Esta aparente falta de necesidad de una señalización específica se ha encontrado también durante la proliferación compensatoria, donde, si bien las células apoptóticas secretan Wg y Dpp, ninguno de estos factores es necesario para restablecer el tamaño de los compartimentos (Perez-Garijo et al., 2009).

Pese a que la respuesta que hemos encontrado se asemeja más a la proliferación compensatoria que a la regeneración por blastema local, no hemos de perder de vista que no estamos provocando un daño disperso como el que desencadena aquella respuesta, sino un daño masivo y localizado. Es de interés hacer notar que en nuestros experimentos hemos inducido daño masivo en los mismos dominios empleados en publicaciones anteriores (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a; Sun and Irvine, 2011). Por ello creemos que este trabajo pone de manifiesto la existencia de un segundo mecanismo de reconstrucción de los discos imaginales en el que el disco entero se comporta como un blastema. Es probable que la elección de uno u otro mecanismo dependa del tipo de daño que se le provoque al disco (ver siguiente sección).

En el caso de la ablación de un compartimento entero, como el posterior, hemos encontrado que la respuesta proliferativa deja de ser sistémica y queda restringida al mismo compartimento posterior. Si bien hemos detectado la presencia de transgresiones del compartimento anterior, y al margen del interés que tiene el fenómeno, éstas en general representan un porcentaje menor del compartimento reconstruido.

En cuanto al patrón temporal de la respuesta, como discutimos en la sección R2f no podemos descartar que en este caso también exista un aumento de la proliferación simultáneo a la ablación. Pero el hecho de encontrar un notorio aumento de la proliferación posterior a la ablación (Fig. r18E-F) implica que es necesario un periodo de proliferación extendido para restaurar la población de células. Esto es diferente de lo encontrado en el *pouch* del ala, donde la respuesta es simultánea y permite que al final de la etapa de ablación el territorio ya esté reconstruido. La diferencia entre estas dos situaciones puede radicar en que, a diferencia de los dominios de linaje abierto, en el caso de un

compartimento no existe una población de células de “recambio” que puedan acceder sin limitaciones al territorio dañado (si bien sí hemos encontrado eventualmente transgresiones). Una posibilidad es que mientras dura la inducción, en las células que no mueren la presencia de *hid* tenga otros efectos que limiten su capacidad de proliferación.

En resumen estamos ante una respuesta autónoma del compartimento, al margen del descubrimiento de transgresiones. Además, no hemos observado efectos de acomodación en el crecimiento del otro compartimento (Bergantinos et al., 2010a; Mesquita et al., 2010), pues este mantiene su patrón de proliferación silvestre. Estos resultados validan la visión de que los compartimentos son unidades autónomas de proliferación (Martin and Morata, 2006; Martin et al., 2009), pues incluso ante la eliminación de una gran cantidad de células en uno de ellos, ambos mantienen su autonomía y alcanzan su tamaño final en momentos diferentes.

Sin embargo, el descubrimiento de que células de un compartimento pueden participar en la reconstrucción de otro, pese a ser numéricamente poco representativas, conlleva que dentro del mecanismo de control del tamaño de los compartimentos existe un nivel de regulación adicional, por el que un compartimento puede reclutar células vecinas en determinadas circunstancias.

Sigue sin conocerse con exactitud cómo funciona este mecanismo que determina el tamaño de un tejido y frena la proliferación una vez alcanzado el tamaño final programado. No obstante, creemos que estudios como este, además de poner de manifiesto la existencia de este control, pueden ayudar a entender cómo funciona.

4.4. EL TIPO DE DAÑO EN EL TEJIDO PUEDEN ACTIVAR DIFERENTES RESPUESTAS

Los resultados que hemos mostrado en esta tesis difieren considerablemente de lo descrito en anteriores publicaciones sobre regeneración tras una ablación genética: en nuestro sistema hemos encontrado una respuesta inmediata, simultánea al daño y sistémica en términos de proliferación que asegura la continuidad del epitelio y que el dominio sobre el que se lleva a cabo la ablación no llegue a desaparecer. Esta respuesta mantendría la funcionalidad del tejido en todo momento y permite una reconstrucción casi perfecta de tamaño y patrón de las alas adultas (Fig. r2).

Esta respuesta puede ser muy diferente de la observable en una amputación, donde se fuerza la interrupción del epitelio. Otros estudios, empleando *rn-Gal4* al igual que nosotros pero *eiger* como

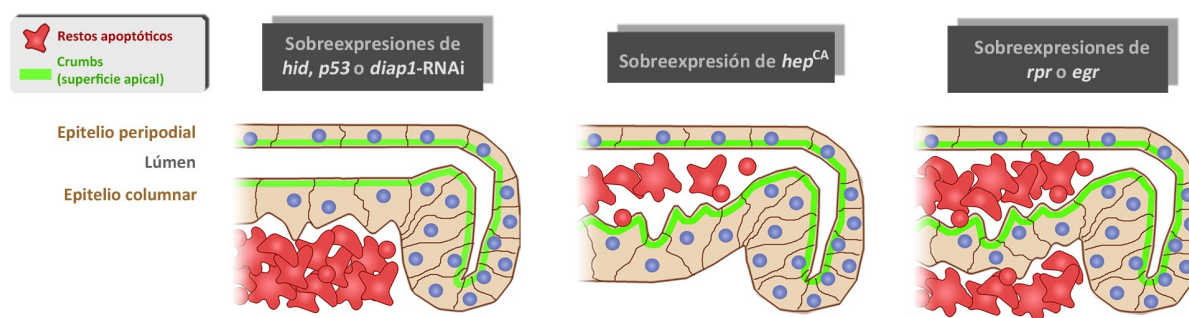


Figura D2. Efectos en la extrusión de restos apoptóticos de cada gen inductor de apoptosis. Diagrama que representa los distintos efectos en el epitelio: *hid*, *p53* y *diap1*-RNAi provocan la extrusión basal de células apoptóticas, *hep^{CA}* extrusión apical y *egr* y *rpr* extrusión por ambas caras del epitelio. Los esquemas muestran la membrana peripodial en la parte superior y el epitelio columnar en la inferior (quedando el lumen entre ambos). Comparar este diagrama con las tinciones mostradas en la Figura r1.

inductor de apoptosis, describieron que la ablación genética llevaba a la formación de un agujero en el *pouch* del ala, lo que sería equivalente a una amputación (Smith-Bolton et al., 2009). En esta tesis hemos repetido estos experimentos y hemos encontrado que en ningún momento se interrumpe el epitelio (ni la integridad apical) con una sobreexpresión de *egr*, si bien sí se encuentran deformaciones morfológicas, con presencia de grandes pliegues ectópicos (Fig. r1E). Creemos que la presencia de estos pliegues profundos ha llevado a los autores a interpretarlos incorrectamente como agujeros en el tejido.

¿Dónde está, entonces, el origen de las diferencias con otros estudios? La nuestra no puede ser una respuesta ante menores niveles de apoptosis, pues los inductores utilizados por otros autores, *egr*, *hep^{CA}* y *rpr* (Smith-Bolton et al., 2009; Bergantinos et al., 2010a; Sun and Irvine, 2011), inducen incluso menores cantidades de muerte celular que *hid* o *p53* (Fig. r1). Otra prueba de que nuestro sistema es más efectivo induciendo muerte es que el porcentaje de territorio final constituido por células originadas fuera del dominio es similar (Bergantinos et al., 2010a) a mucho mayor (Smith-Bolton et al., 2009) al de estos trabajos (Fig. r6). En cambio sí hemos observado que estas 3 construcciones producen una extrusión por la cara apical del epitelio de los cuerpos apoptóticos (exclusivamente por la cara apical en el caso de *hep^{CA}*, por ambas caras en el de *egr* y *rpr*), que quedan encerrados en el lumen. Este fenómeno difiere de lo hallado para los factores pro-apoptóticos estudiados en esta tesis o la descripción general de la apoptosis, pues los cuerpos apoptóticos son extruidos basalmente (Gibson and Perrimon, 2005; Li and Baker, 2007). Sólo en cultivos celulares, en determinados

contextos, se han descrito fenómenos de extrusión apical (Hogan et al. 2009). Estas diferencias se esquematizan en la Figura d2.

Creemos, entonces, que la explicación a las diferencias entre estos estudios y el nuestro está en que pueden existir dos mecanismos de respuesta por parte del tejido ante distintos tipos de daño. La diferencia en el mecanismo de extrusión puede ser un reflejo de que el daño que inducen es de distinta naturaleza, por lo que cada inductor dispararía una respuesta.

En el caso de *egr* y *hep*^{CA} hay que añadir que el primero es un ligando extracelular difusible que podría estar induciendo efectos no autónomos en las células vecinas. El segundo es un componente de la vía JNK, para la que se asignan otros roles además del de inducir apoptosis (ver Introducción), que podrían ser responsables del fenotipo observado.

45. EL PAPEL DE LA VÍA JNK

En nuestros experimentos hemos ensayado el papel que cumple la vía JNK específicamente en las células en contacto con el dominio que sufre la ablación. En el caso del dominio Rn hemos encontrado que al bloquear esta ruta con el inhibidor *puckererd* en una fracción de las células que rodean el *pouch*, éstas no son capaces de acceder y repoblar este territorio. Este resultado es semejante a lo encontrado en las ablaciones mediadas por *rpr* y *hep*^{CA}, donde la falta de actividad de la vía impide el correcto cierre del epitelio, afecta a la respuesta proliferativa del disco (Bergantinos et al., 2010a) e impide la inactivación de la vía de *hippo* (Sun and Irvine, 2011). Pese a las diferencias que hemos descrito que presenta la respuesta ante ablación con *hid* respecto a otros inductores, este resultado valida que la actividad JNK es una característica central a todos los procesos de regeneración y homeostasis (Bergantinos et al., 2010b; Worley et al., 2012).

Es probable que, al igual que ocurre durante las transdeterminaciones (Lee et al., 2005), la modificación de la actividad de los complejos PcG encontrada tras la ablación del compartimento posterior esté desencadenada por una activación de la vía JNK. Este papel sería coherente con lo que sucede en las “células intercalantes” del cierre dorsal del embrión, donde la activación de la ruta es necesaria para el cambio de identidad de anterior a posterior (Gettings et al., 2010). Deben realizarse en un futuro experimentos de supresión de esta vía en el contexto de ablación de compartimentos para confirmar esta hipótesis.

4.6. LOS DISCOS IMAGINALES COMO MODELO DE HOMEOSTASIS Y REGENERACIÓN

Los organismos que se consideran tradicionalmente modelos de regeneración, como hidras, planarias o salamandras, no son precisamente organismos apropiados para la manipulación genética (Sanchez Alvarado, 2000). La ausencia de herramientas genéticas en ellos lleva a la dificultad o incluso imposibilidad de realizar ensayos funcionales de genes, que se limitan al empleo de RNAs de interferencia o drogas (Reddien et al., 2005; Galliot et al., 2007; Chera et al., 2011). Los discos imaginales son sistemas en crecimiento donde las células no diferencian (si bien sí adquieren determinación), lo que puede limitar la capacidad de extrapolar la respuesta homeostática que hemos encontrado a lo que ocurre durante la regeneración de estos organismos. Sin embargo, la amplia disponibilidad de herramientas y el conocimiento profundo que se tiene de su crecimiento y morfogénesis hacen de los discos imaginales de *D. melanogaster* un sistema idóneo para descubrir características, fenómenos y respuestas moleculares que posteriormente se pueden trasladar a la regeneración de estos organismos.

En este sentido, queremos remarcar que en este trabajo se han empleado una gran variedad de nuevas herramientas genéticas disponibles: nuevos sistemas de marcaje de linaje (Evans et al., 2009), puertas lógicas de ganancia de Gal80 (Bohm et al., 2010) o empleo del sistema binario de expresión alternativo QF/QUAS (Potter et al., 2010; Potter and Luo, 2011). En especial, este trabajo es el primero experimental del que tenemos constancia hasta la fecha que ha hecho uso de estos nuevos sistemas binarios, al margen de otros trabajos de extensión y desarrollo de las técnicas (Gohl et al., 2011; Petersen and Stowers, 2011; Venken et al., 2011).

En concreto, creemos que la pareja de líneas *rn-Gal4/GH146-QF* es un sistema muy apropiado para la manipulación simultánea e independiente de las células que mueren y de las que pueden reconstruir el dominio. Hemos empleado estas pareja de líneas para estudiar la relevancia funcional de la vía JNK en las células que regeneran el dominio Rn (ver sección D5) y por ello consideramos que puede ser útil para futuros *screens* de moduladores de la capacidad homeostática o regenerativa. Por su parte, la estrategia que hemos creado de inducir clonalmente el *cassette tubP>stop>Gal80* (diseñado originalmente para crear puertas lógicas “NOT”, ver Materiales y Métodos) puede ser usado en un futuro para cualquier estudio de efectos no autónomos de la sobreexpresión de genes.

C. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

1) Los discos imaginales poseen una capacidad homeostática inmediata que les permite mantener la integridad y continuidad del epitelio, reconstruyéndolo de forma simultánea a la ablación de un gran dominio como el *pouch* del ala.

2) Las células que reconstruyen el *pouch* tienen un origen exterior a esta estructura y acceden allí mediante migración celular. Además, estas células adquieren inmediatamente los marcadores genéticos propios del *pouch*.

3) Ante la ablación de un dominio de linaje abierto (como el *pouch* del ala) tiene lugar una respuesta proliferativa inmediata y sistémica en la que todas las células del disco incrementan su ritmo de división. En el caso de dominios de linaje cerrado, como los compartimentos, la respuesta se restringe al propio dominio. Los compartimentos mantienen su autonomía proliferativa.

4) La activación de la ruta de señalización JNK es necesaria en las células que rodean el dominio eliminado para que puedan participar en su reconstrucción.

5) Ante la eliminación masiva de células dentro de un compartimento, el borde de compartimentos se vuelve interdigitado y células de ambos compartimentos se mezclan y cambian de identidad genética, indicando que los bordes de compartimentos colapsan de forma transitoria. Estas transgresiones participan en la reconstrucción del compartimento dañado.

6) Un proceso de remodelación de la cromatina hace permisivo el cambio de identidad de compartimento, siendo necesarias una disminución de la actividad de los genes PcG y un aumento de la de los genes *trxG*.

7) El cambio de identidad celular que tiene lugar en las transgresiones de bordes de compartimentos puede explicarse porque existe un fenómeno inesperado de inducción no autónoma de la expresión de genes selectores como *engrailed* o *Ultrabithorax*. Esta inducción se manifiesta cuando células que expresan estos genes rodean a células que no los expresan.

1) The imaginal discs have an immediate homeostatic capacity that allows them to maintain the continuity and integrity of the epithelium, reconstructing the tissue simultaneously to the ablation of a big domain like the wing pouch.

2) The cells that reconstruct the wing pouch are originated outside from this structure and access to it by cell migration. Furthermore, these cells acquire immediately the pouch genetic markers.

3) The proliferative response after the ablation of an open lineage domain (like the wing pouch) is immediate and systemic in all the cells of the disc, which increase their division rate. In the case of close lineage domains, like compartments, the response is restricted to the ablated domain. The compartments maintain their proliferative autonomy.

4) The activation of the JNK signaling pathway is necessary in the cells that surround the ablated domain for participating in its reconstruction.

5) After massive elimination of cells within a compartment, the compartments boundary becomes interdigitated and cells from both compartments mingle and change their genetic identity, indicating that the compartments boundaries collapse temporally. These transgressions participate in the reconstruction of the damaged compartment.

6) A chromatin remodeling process permits the change of compartment identity, mediated by PcG genes downregulation and trxG genes upregulation.

7) The change of cell identity in the transgressions of compartment boundaries can be explained because of the existence of an unexpected non-autonomous induction phenomenon of the expression of selector genes like *engrailed* or *Ultrabithorax*. This induction is manifested in situations of cells expressing these genes surrounding cells without them.

REFERENCES

- Abbott, L. C., Karpen, G. H. and Schubiger, G. (1981) 'Compartmental restrictions and blastema formation during pattern regulation in *Drosophila* imaginal leg discs', *Developmental biology* 87 (1): 64-75.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P., W. Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al. (2000) 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science* 287(5461): 2185-95.
- Agata, K., Saito, Y. and Nakajima, E. (2007) 'Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis', *Development, growth & differentiation* 49(2): 73-8.
- Baguña, J. (2012) 'The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes', *The International journal of developmental biology* 56(1-3): 19-37.
- Beisel, C. and Paro, R. (2011) 'Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms', *Nature reviews. Genetics* 12(2): 123-35.
- Bejarano, F. and Milan, M. (2009) 'Genetic and epigenetic mechanisms regulating hedgehog expression in the *Drosophila* wing', *Developmental biology* 327(2): 508-15.
- Bergantinos, C., Corominas, M. and Serras, F. (2010a) 'Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling', *Development* 137(7): 1169-79.
- Bergantinos, C., Vilana, X., Corominas, M. and Serras, F. (2010b) 'Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32(3): 207-17.
- Bienz, M. and Tremml, G. (1988) 'Domain of Ultrabithorax expression in *Drosophila* visceral mesoderm from autoregulation and exclusion', *Nature* 333(6173): 576-8.
- Blair, S. S. (1992) 'Engrailed expression in the anterior lineage compartment of the developing wing blade of *Drosophila*', *Development* 115(1): 21-33.
- Blair, S. S. (2003) 'Lineage compartments in *Drosophila*', *Current biology : CB* 13(14): R548-51.
- Blanco, E., Ruiz-Romero, M., Beltran, S., Bosch, M., Punset, A., Serras, F. and Corominas, M. (2010) 'Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs', *BMC developmental biology* 10: 94.
- Bohm, R. A., Welch, W. P., Goodnight, L. K., Cox, L. W., Henry, L. G., Gunter, T. C., Bao, H. and Zhang, B. (2010) 'A genetic mosaic approach for neural circuit mapping in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(37): 16378-83.
- Bosch, M., Baguna, J. and Serras, F. (2008) 'Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs', *The International journal of developmental biology* 52(8): 1043-50.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E. and Baguna, J. (2005) 'JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs', *Developmental biology* 280(1): 73-86.

- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development* 118(2): 401-15.
- Breen, T. R., Chinwalla, V. and Harte, P. J. (1995) 'Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells', *Mechanisms of development* 52(1): 89-98.
- Brooke, N. M. and Holland, P. W. (2003) 'The evolution of multicellularity and early animal genomes', *Current opinion in genetics & development* 13(6): 599-603.
- Brower, D. L., Lawrence, P. A. and Wilcox, M. (1981) 'Clonal analysis of the undifferentiated wing disk of *Drosophila*', *Developmental biology* 86(2): 448-55.
- Bryant, P. J. (1971) 'Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*', *Developmental biology* 26(4): 637-51.
- Bryant, P. J. (1975a) 'Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication', *The Journal of experimental zoology* 193(1): 49-77.
- Bryant, P. J. (1975b) 'Regeneration and duplication in imaginal discs', *Ciba Foundation symposium* 0 (29): 71-93.
- Burke, R. and Basler, K. (1996) 'Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing', *Development* 122(7): 2261-9.
- Busturia, A. and Morata, G. (1988) 'Ectopic expression of homeotic genes caused by the elimination of the Polycomb gene in *Drosophila* imaginal epidermis', *Development* 104(4): 713-20.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996) 'Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*', *Science* 274(5285): 252-5.
- Carroll, S. B., Grenier, J. K. and Weatherbee, S. D. (2001) 'From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design', *Blackwell Publishing Limited*.
- Castelli-Gair, J., Greig, S., Micklem, G. and Akam, M. (1994) 'Dissecting the temporal requirements for homeotic gene function', *Development* 120(7): 1983-95.
- Cavodeassi, F., Rodriguez, I. and Modolell, J. (2002) 'Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax', *Development* 129(16): 3815-23.
- Cohen, B., Wimmer, E. A. and Cohen, S. M. (1991) 'Early development of leg and wing primordia in the *Drosophila* embryo', *Mechanisms of development* 33(3): 229-40.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and de Celis, J. F. (2009) 'A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing', *Genetics* 183 (3): 1005-26.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J. C. and Galliot, B. (2009) 'Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration', *Developmental cell* 17(2): 279-89.
- Chera, S., Ghila, L., Wenger, Y. and Galliot, B. (2011) 'Injury-induced activation of the MAPK/CREB pathway triggers apoptosis-induced compensatory proliferation in hydra head regeneration', *Development, growth & differentiation* 53(2): 186-201.

- Chiang, A., O'Connor, M. B., Paro, R., Simon, J. and Bender, W. (1995) 'Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex', *Development* 121(6): 1681-9.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. (2004) 'Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition', *Cell* 117(1): 107-16.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993) 'Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila', *Cell* 75(4): 741-52.
- Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F. and Modolell, J. (1999) 'The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in Drosophila', *Genes & development* 13(13): 1754-61.
- DiNardo, S. and O'Farrell, P. H. (1987) 'Establishment and refinement of segmental pattern in the Drosophila embryo: spatial control of engrailed expression by pair-rule genes', *Genes & development* 1(10): 1212-25.
- Dyson, F. (1997) 'Imagined Worlds', *Oxford University Press*.
- Echeverri, K. and Tanaka, E. M. (2002) 'Mechanisms of muscle dedifferentiation during regeneration', *Seminars in cell & developmental biology* 13(5): 353-60.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986) 'Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*', *Cell* 44(6): 817-29.
- Evans, C. J., Olson, J. M., Ngo, K. T., Kim, E., Lee, N. E., Kuoy, E., Patananan, A. N., Sitz, D., Tran, P., Do, M. T. et al. (2009) 'G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in Drosophila', *Nature methods* 6(8): 603-5.
- Filion, G. J., van Bemmelen, J. G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L. D., Brugman, W., de Castro, I. J., Kerkhoven, R. M., Bussemaker, H. J. et al. (2010) 'Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells', *Cell* 143(2): 212-24.
- Finnerty, J. R. (2003) 'The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry?', *The International journal of developmental biology* 47(7-8): 523-9.
- Francis, N. J. and Kingston, R. E. (2001) 'Mechanisms of transcriptional memory', *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(6): 409-21.
- Frohnhofer, H. G., Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C. (1986) 'Manipulating the anteroposterior pattern of the Drosophila embryo', *Journal of embryology and experimental morphology* 97 Suppl: 169-79.
- Fuchs, Y. and Steller, H. (2011) 'Programmed cell death in animal development and disease', *Cell* 147(4): 742-58.
- Galliot, B. and Chera, S. (2010) 'The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration', *Trends in cell biology* 20(9): 514-23.
- Galliot, B. and Ghila, L. (2010) 'Cell plasticity in homeostasis and regeneration', *Molecular reproduction and development* 77(10): 837-55.

- Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., Ghila, L. and Chera, S. (2007) 'RNAi gene silencing affects cell and developmental plasticity in hydra', *Comptes rendus biologies* 330(6-7): 491-7.
- Galliot, B., Tanaka, E. and Simon, A. (2008) 'Regeneration and tissue repair: themes and variations', *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65(1): 3-7.
- Garaulet, D. L., Foronda, D., Calleja, M. and Sanchez-Herrero, E. (2008) 'Polycomb-dependent Ultrabithorax Hox gene silencing induced by high Ultrabithorax levels in *Drosophila*', *Development* 135(19): 3219-28.
- Garcia-Bellido, A. (1975) 'Genetic control of wing disc development in *Drosophila*', *Ciba Foundation symposium* 0(29): 161-82.
- Garcia-Bellido, A., Cortes, F. and Milan, M. (1994) 'Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(21): 10222-6.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973) 'Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*', *Nature: New biology* 245(147): 251-3.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1976) 'Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*', *Developmental biology* 48(1): 132-47.
- Gehring, W. (1967) 'Clonal analysis of determination dynamics in cultures of imaginal disks in *Drosophila melanogaster*', *Developmental biology* 16(5): 438-56.
- Gettings, M., Serman, F., Rousset, R., Bagnerini, P., Almeida, L. and Noselli, S. (2010) 'JNK signalling controls remodelling of the segment boundary through cell reprogramming during *Drosophila* morphogenesis', *PLoS biology* 8(6): e1000390.
- Gibson, M. C. and Perrimon, N. (2005) 'Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing', *Science* 307(5716): 1785-9.
- Gohl, D. M., Silies, M. A., Gao, X. J., Bhalerao, S., Luongo, F. J., Lin, C. C., Potter, C. J. and Clandinin, T. R. (2011) 'A versatile in vivo system for directed dissection of gene expression patterns', *Nature methods* 8(3): 231-7.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. and Calos, M. P. (2004) 'Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31', *Genetics* 166(4): 1775-82.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sanchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I. (1995) 'The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern', *Development* 121(10): 3447-56.
- Hadorn, E. (1965) 'Problems of determination and transdetermination', *Brookhaven Symp. Biol.* 18: 148-61.
- Hadorn, E. (1968) 'Transdetermination in cells', *Scientific American* 219(5): 110-4 passim.
- Hadorn, E. and Buck, D. (1962) 'On the differentiation of transplanted wing imaginal disc fragments of *Drosophila melanogaster*', *Rev. Suisse Zool* 69: 302-310.
- Hall, M. G. (1985) A Study of the sumerian moon-god Nanna/Suen: University of Pennsylvania.

- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1990) 'Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter', *Genes & development* 4(7): 1079-93.
- Hay, B. A. and Guo, M. (2006) 'Caspase-dependent cell death in *Drosophila*', *Annual review of cell and developmental biology* 22: 623-50.
- Haynie, J. and Bryant, J. P. (1977) 'The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*', *Roux's Arch. Dev. Biol.* 183: 85-100.
- Hidalgo, A. (1994) 'Three distinct roles for the engrailed gene in *Drosophila* wing development', *Current biology : CB* 4(12): 1087-98.
- Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A. E., Piddini, E., Baena-Lopez, L. A., Vincent, J. P., Itoh, Y. et al. (2009) 'Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells', *Nature cell biology* 11(4): 460-7.
- Holland, P. W. (1999) 'The future of evolutionary developmental biology', *Nature* 402(6761 Suppl): C41-4.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S. and Pirrotta, V. (2000) 'Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor', *Molecular and cellular biology* 20(9): 3187-97.
- Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004) 'Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role', *Current biology : CB* 14(14): 1262-6.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A. and Xu, T. (2006) 'Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*', *Current biology : CB* 16(11): 1139-46.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D. (1997) 'The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells', *Development* 124(4): 761-71.
- Jackle, H., Hoch, M., Pankratz, M. J., Gerwin, N., Sauer, F. and Bronner, G. (1992) 'Transcriptional control by *Drosophila* gap genes', *Journal of cell science. Supplement* 16: 39-51.
- Jiang, H. and Edgar, B. A. (2011) 'Intestinal stem cells in the adult *Drosophila* midgut', *Experimental cell research* 317(19): 2780-8.
- Johnston, L. A. and Schubiger, G. (1996) 'Ectopic expression of wingless in imaginal discs interferes with decapentaplegic expression and alters cell determination', *Development* 122(11): 3519-29.
- Kanda, H. and Miura, M. (2004) 'Regulatory roles of JNK in programmed cell death', *Journal of biochemistry* 136(1): 1-6.
- Kassis, J. A. (1994) 'Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region', *Genetics* 136(3): 1025-38.
- Kennison, J. A. (1995) 'The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function', *Annual review of genetics* 29: 289-303.

- Kennison, J. A. and Tamkun, J. W. (1988) 'Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(21): 8136-40.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H. and Tanaka, E. M. (2009) 'Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration', *Nature* 460(7251): 60-5.
- Landsberg, K. P., Farhadifar, R., Ranft, J., Umetsu, D., Widmann, T. J., Bittig, T., Said, A., Julicher, F. and Dahmann, C. (2009) 'Increased cell bond tension governs cell sorting at the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary', *Current biology : CB* 19(22): 1950-5.
- Lawrence, P. A. (1992) *The Making of a Fly*: Blackwell Scientific Publications.
- Lawrence, P. A. and Morata, G. (1976) 'Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the engrailed gene', *Developmental biology* 50(2): 321-37.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G. (1996) 'Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*?', *Cell* 85(7): 951-61.
- Lee, N., Maurange, C., Ringrose, L. and Paro, R. (2005) 'Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs', *Nature* 438(7065): 234-7.
- Leulier, F., Ribeiro, P. S., Palmer, E., Tenev, T., Takahashi, K., Robertson, D., Zachariou, A., Pichaud, F., Ueda, R. and Meier, P. (2006) 'Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the *Drosophila* cell death machinery', *Cell death and differentiation* 13(10): 1663-74.
- Lewis, E. B. (1978) 'A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*', *Nature* 276(5688): 565-70.
- Li, W. and Baker, N. E. (2007) 'The active role of corpse engulfment pathways during cell competition', *Fly* 1(5): 274-8.
- Madhavan, M. M. and A., S. H. (1977) 'Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblasts nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*.', *Wilhelm Roux's Archives*(183): 269-305.
- Major, R. J. and Irvine, K. D. (2005) 'Influence of Notch on dorsoventral compartmentalization and actin organization in the *Drosophila* wing', *Development* 132(17): 3823-33.
- Mann, R. S. and Morata, G. (2000) 'The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*', *Annual review of cell and developmental biology* 16: 243-71.
- Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S. E. and Perrimon, N. (2008) 'Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes', *Nature genetics* 40(4): 476-83.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A. (1998) 'puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*', *Genes & development* 12(4): 557-70.
- Martin-Castellanos, C. and Edgar, B. A. (2002) 'A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing', *Development* 129(4): 1003-13.

- Martin, F. A., Herrera, S. C. and Morata, G. (2009) 'Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development* 136(22): 3747-56.
- Martin, F. A. and Morata, G. (2006) 'Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development* 133(22): 4421-6.
- Martin, F. A., Perez-Garijo, A., Moreno, E. and Morata, G. (2004) 'The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*', *Development* 131(20): 4921-30.
- Maves, L. and Schubiger, G. (1998) 'A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling', *Development* 125(1): 115-24.
- McClure, K. D. and Schubiger, G. (2008) 'A screen for genes that function in leg disc regeneration in *Drosophila melanogaster*', *Mechanisms of development* 125(1-2): 67-80.
- McClure, K. D., Sustar, A. and Schubiger, G. (2008) 'Three genes control the timing, the site and the size of blastema formation in *Drosophila*', *Developmental biology* 319(1): 68-77.
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. and Davis, R. L. (2003) 'Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*', *Science* 302(5651): 1765-8.
- McNeill, H. (2000) 'Sticking together and sorting things out: adhesion as a force in development', *Nature reviews. Genetics* 1(2): 100-8.
- Merabet, S., Hombria, J. C., Hu, N., Pradel, J. and Graba, Y. (2005) 'Hox-controlled reorganisation of intrasegmental patterning cues underlies *Drosophila* posterior spiracle organogenesis', *Development* 132(13): 3093-102.
- Mesquita, D., Dekanty, A. and Milan, M. (2010) 'A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*', *PLoS biology* 8(12): e1000566.
- Milan, M., Perez, L. and Cohen, S. M. (2002) 'Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing', *Developmental cell* 2(6): 797-805.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A. (1997) 'Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(11): 5691-6.
- Mishra, R. K., Mihaly, J., Barges, S., Spierer, A., Karch, F., Hagstrom, K., Schweinsberg, S. E. and Schedl, P. (2001) 'The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity', *Molecular and cellular biology* 21(4): 1311-8.
- Morata, G. (2001) 'How *Drosophila* appendages develop', *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(2): 89-97.
- Morata, G. and Herrera, S. C. (2010) 'Differential division rates and size control in the wing disc', *Fly* 4(3).
- Morata, G. and Lawrence, P. A. (1975) 'Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*', *Nature* 255(5510): 614-7.

- Morata, G., Shlevkov, E. and Perez-Garijo, A. (2011) 'Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*', *Development, growth & differentiation* 53(2): 168-76.
- Moreno, E. and Basler, K. (2004) 'dMyc transforms cells into super-competitors', *Cell* 117(1): 117-29.
- Moreno, E., Basler, K. and Morata, G. (2002a) 'Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development', *Nature* 416(6882): 755-9.
- Moreno, E., Yan, M. and Basler, K. (2002b) 'Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily', *Current biology : CB* 12(14): 1263-8.
- Morgan, T. H. (1901) *Regeneration*: New York: The Macmillan Company.
- Morrison, J. I., Loof, S., He, P. and Simon, A. (2006) 'Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population', *The Journal of cell biology* 172(3): 433-40.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', *Nature* 287(5785): 795-801.
- Orlando, V., Jane, E. P., Chinwalla, V., Harte, P. J. and Paro, R. (1998) 'Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis', *The EMBO journal* 17(17): 5141-50.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G. (2004) 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*', *Development* 131(22): 5591-8.
- Perez-Garijo, A., Shlevkov, E. and Morata, G. (2009) 'The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc', *Development* 136(7): 1169-77.
- Petersen, L. K. and Stowers, R. S. (2011) 'A Gateway MultiSite recombination cloning toolkit', *PloS one* 6(9): e24531.
- Pfeiffer, T. and Bonhoeffer, S. (2003) 'An evolutionary scenario for the transition to undifferentiated multicellularity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3): 1095-8.
- Pirrotta, V. (1995) 'Chromatin complexes regulating gene expression in *Drosophila*', *Current opinion in genetics & development* 5(4): 466-72.
- Potter, C. J. and Luo, L. (2011) 'Using the Q system in *Drosophila melanogaster*', *Nature protocols* 6(8): 1105-20.
- Potter, C. J., Tasic, B., Russler, E. V., Liang, L. and Luo, L. (2010) 'The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis', *Cell* 141(3): 536-48.
- Reddien, P. W., Bermange, A. L., Murfitt, K. J., Jennings, J. R. and Sanchez Alvarado, A. (2005) 'Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria', *Developmental cell* 8(5): 635-49.

- Reddien, P. W. and Sanchez Alvarado, A. (2004) 'Fundamentals of planarian regeneration', *Annual review of cell and developmental biology* 20: 725-57.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H. (2004) 'Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways', *Developmental cell* 7(4): 491-501.
- Sanchez Alvarado, A. (2000) 'Regeneration in the metazoans: why does it happen?', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22(6): 578-90.
- Sanchez Alvarado, A. (2004) 'Planarians', *Current biology : CB* 14(18): R737-8.
- Schubiger, G. (1971) 'Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of *Drosophila melanogaster*', *Developmental biology* 26(2): 277-95.
- Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N. and Cavalli, G. (2011) 'Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active', *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(12): 799-814.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V. (2007) 'Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes', *Nature reviews. Genetics* 8(1): 9-22.
- Shlevkov, E. and Morata, G. (2012) 'A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*', *Cell death and differentiation* 19(3): 451-60.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. and Bell, J. B. (1995) 'Distinguishable functions for engrailed and invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing', *Nature* 376(6539): 424-7.
- Slack, J. M. (2003) 'Regeneration research today', *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 226(2): 162-6.
- Smith-Bolton, R. K., Worley, M. I., Kanda, H. and Hariharan, I. K. (2009) 'Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc', *Developmental cell* 16(6): 797-809.
- St Pierre, S. E., Galindo, M. I., Couso, J. P. and Thor, S. (2002) 'Control of *Drosophila* imaginal disc development by rotund and roughened eye: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins', *Development* 129(5): 1273-81.
- Struhl, G. and Basler, K. (1993) 'Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*', *Cell* 72(4): 527-40.
- Sun, G. and Irvine, K. D. (2011) 'Regulation of Hippo signaling by Jun kinase signaling during compensatory cell proliferation and regeneration, and in neoplastic tumors', *Developmental biology* 350(1): 139-51.
- Szabad, J., Simpson, P. and Nothiger, R. (1979) 'Regeneration and compartments in *Drosophila*', *Journal of embryology and experimental morphology* 49: 229-41.
- Tabata, T. and Takei, Y. (2004) 'Morphogens, their identification and regulation', *Development* 131(4): 703-12.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1995) 'Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis', *Development* 121(10): 3359-69.

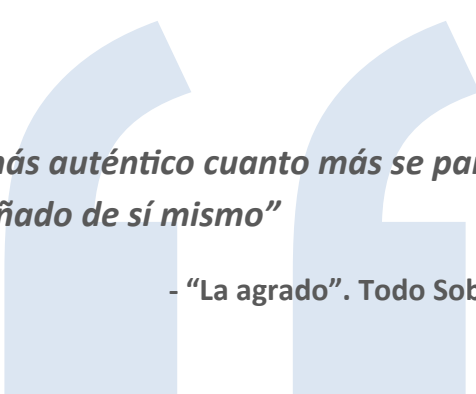
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P. and Tabata, T. (2000) 'Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs', *Molecular cell* 5(1): 59-71.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. and Mazo, A. (1999) 'Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences', *Molecular and cellular biology* 19(7): 5189-202.
- Venken, K. J., Schulze, K. L., Haelterman, N. A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J. W., Levis, R. W., Spradling, A. C., Hoskins, R. A. et al. (2011) 'MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes', *Nature methods* 8(9): 737-43.
- Weigmann, K. and Cohen, S. M. (1999) 'Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg', *Development* 126(17): 3823-30.
- Wells, B. S. and Johnston, L. A. (2012) 'Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53', *Developmental biology* 361(2): 263-76.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H. (1994) 'Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*', *Science* 264(5159): 677-83.
- White, R. A. and Wilcox, M. (1985) 'Distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*', *The EMBO journal* 4(8): 2035-43.
- Worley, M. I., Setiawan, L. and Hariharan, I. K. (2012) 'Regeneration and Transdetermination in *Drosophila* Imaginal Discs', *Annual review of genetics* 46:289-310.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T. (2010) 'Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion', *Nature* 463(7280): 545-8.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R. (1980) 'Cell death: the significance of apoptosis', *International review of cytology* 68: 251-306.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993) 'Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues', *Development* 117(4): 1223-37.
- Yagi, R., Mayer, F. and Basler, K. (2010) 'Refined LexA transactivators and their use in combination with the *Drosophila* Gal4 system', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(37): 16166-71.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002a) 'Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling', *Development* 129(6): 1369-76.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002b) 'Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling', *Development* 129(6): 1357-68.

ANEXO I: ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
A/P	Borde antero-posterior
act	<i>actina</i>
ap	<i>apterous</i>
BDSC	"Bloomington Drosophila Stock Center"
Casp3	Caspasa-3 activada
ci	<i>cubitus interruptus</i>
D/V	Borde dorso-ventral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpp	<i>decapentaplegic</i>
DSHB	"Developmental Studies Hybridoma bank"
en	<i>engrailed</i>
Flp	Flipasa
FRT	"Flipase Recombination Target"
GFP	"Green Fluorescent Protein"
hep	<i>hemipterous</i>
hh	<i>hedgehog</i>
hid	<i>head involution defective</i>
hs	Promotor de gen de heat-shock
IAP	"Inhibitor of Apoptosis Proteins"
JNK	Jun N-terminal Kinasa
LacZ/βgal	β-Galactosidasa
mew	<i>multiple edematous wings</i>
nub	<i>nubbin</i>
Pc	<i>Polycomb</i>
PcG	Grupo Polycomb
PH3	Histona 3 fosforilada

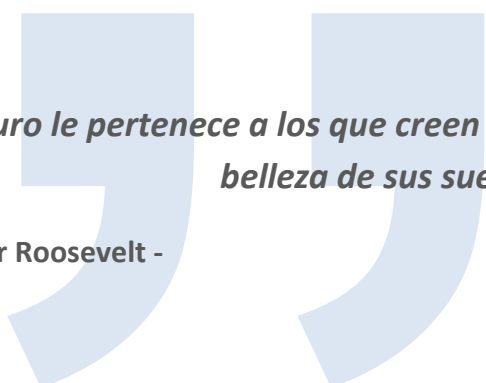
PRE	"Polycomb Response Element"
Psc	<i>Posterior Sex Combs</i>
puc	<i>puckered</i>
rn	<i>rotund</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
rpr	<i>reaper</i>
sal	<i>spalt</i>
TRE	"Trithorax Response Element"
trx	<i>trithorax</i>
trxG	Grupo Trithorax
TS	Termo-sensible
tub	<i>tubulina</i>
UAS	"Upstream Activating Sequences"
ubi	<i>ubiquitina</i>
Ubx	<i>Ultrabithorax</i>
w	<i>white</i>
wg	<i>wingless</i>
y	<i>yellow</i>

ANEXO II: AGRADECIMIENTOS



“Uno es más auténtico cuanto más se parece a lo que ha soñado de sí mismo”

- “La agrado”. Todo Sobre mi Madre -



“El futuro le pertenece a los que creen en la belleza de sus sueños”

- Eleanor Roosevelt -

Mucha gente dice que esta es la parte más complicada de escribir de una tesis. En mi caso tengo que decir lo contrario: ha sido la más fácil, y de hecho la primera que empecé a redactar. Quizá la razón sea que los que aparecéis aquí sois responsables de que ésta haya sido la mejor etapa de mi vida. No hay dificultad, vale, pero sí una responsabilidad muy grande: yo creo que una tesis doctoral, entre otras cosas, es el legado que dejas en un laboratorio y en tu gente, pero los agradecimientos es el legado que esa gente ha dejado en ti.

Esta tesis, además de mi “hija”, es hija de su tiempo, y creo que es imposible no mencionar la situación en la que está ahora este país, porque estos 5 años de tesis también han sido los 5 años en los que hemos visto como se han degradado la economía, el sistema científico, la calidad de vida de las personas e incluso la moralidad. <<Nos dejaron las balas y un enjambre de abejas: ese fue su tesoro y una noche oxidada>> dice la letra de una canción. Hasta hace 5 años soñábamos con un país cada vez mejor e invertíamos en ese sueño. Me pregunto en que punto nos cambiaron la palabra Soñar por la palabra Deuda. Deuda con no sabemos exactamente quién.

Vaya paradoja, ¿no? en estos años hemos descubierto que no teníamos nada, excepto una deuda contraída. Yo entré con muchos sueños al laboratorio también, y ahora he descubierto que he contraído una deuda enorme con todos vosotros. La diferencia es que esta deuda es bella. Esta pesadilla no terminará porque ciertas personas recuperen eso que llaman “confianza”, sino por el esfuerzo y los sueños de personas como nosotros: de los que nos iremos un tiempo fuera buscando un futuro y trabajando por volver, de los que os quedaréis aquí porque aguantaréis y lo prepararéis todo para nuestro regreso. Dadme el gusto de hablaros sobre mi deuda:

Con Ginés, mi director, no hay páginas suficientes que hagan justicia a lo agradecido que estoy con él. Gracias por darme la oportunidad de hacer una tesis contigo y de conocer a la grandísima persona que hay tras el genio científico. Por ser generoso sin hacer ninguna pregunta antes. Por animarme y apoyarme en cualquier idea loca que se me ocurría. Por re-encauzarme luego cuando la mitad de esas ideas no iban a ninguna parte. Por las bromas, por el entusiasmo con todo, las palabras exóticas en inglés que nos enseñas (marauder, piscatorian...), las aventuras en el Himalaya y las críticas permanentes a mi vestuario y a mi “peculiar sentido de la estética”. Gracias por todo, de corazón.

A Ernesto por ser como un segundo director que se preocupa de ti y de tu proyecto. Por el grandísimo científico y la todavía mejor persona que eres. Por el finísimo sentido del humor. Por tantas y tantas ideas que nos aportas. Porque creerás que esos consejos caen en saco roto y no: alguna que otra vez te hacemos caso y, oye, descubrimos que tenías toda la razón. Por lo divertido y encantador que eres cuando vienes a alguna cena o cañas. Porque pese a que encarnas el orden y la perfección alguna vez he visto que te dejas una caja de moscas abandonada en la flyroom. Qué ha hecho contigo la gente de tu laboratorio...

A mi tutora académica Sonsoles, no sólo por ser la más rápida, eficiente y disponible, que siempre compensa mis despistes y papeles que entrego en el último minuto del plazo. Te tengo que agradecer mucho más el cariño que me has mostrado siempre.

A la gente del laboratorio, sin más orden que en el que os fui conociendo:

A Manolo, porque con sorna dices que esto no es un club de amigos, pero todos sabemos que te importamos mucho. Y a ti no te importa hacérselo ver de vez en cuando. Por el cariño, los consejos, lo ácido, lo dulce, la charla al meterme en el confocal o tirar el hielo por la pila, por las fuerzas reservadas para salir corriendo. Porque nunca tienes miedo a empezar cosas nuevas. Gracias.

A Nati, por convencerme de que correr no es de cobardes. Al final me hice 2 veces la carrera de CSIC, para que veas. Por tanto, tantísimo apoyo al hacer cosas de biología molecular. Por espolearme para irme a hacer una estancia para aprender a hacer ChIPs. Por esos cotilleos sobre las altas esferas del poder en el CSIC.

Angelica, sin ti esto sería la famosa orgía de descerebrados. Gracias por la santa paciencia, por ser nuestra psiquiatra clínica, por tirarte sin red a vacilarle a todo el mundo, por ser la primera en ponerse la peluca en los vídeos de tesis... ¡pero qué digo!, ¡por tu culpa esto es una maravillosa orgía de descerebrados! El día que escribas un libro puede ser grandioso. Coincidiremos otra vez, pero hoy no: maaañññana.

Rosa. Porque con toda la gente que ha ido yendo y viniendo los años que he estado aquí tú has sido lo constante, ese precioso rincón de paz y alegría del laboratorio. Porque estás siempre atenta a las cosas que de verdad importan y nos tratas a todos por igual, con cariño. Por custodiar con celo la liturgia de la lotería de Navidad.

Paco, mi *sensei*, el que me llevó de la mano durante mi primer año para que no me perdiera ni tropezara. Por la bellísima persona que hay detrás del personaje. Porque te dejaste por aquí un disco de Prince (con una portada sobrecogedora) y todavía no he sabido cómo deshacerme de él. Por las advertencias sobre las maldades del trigo y la leche. Por tantísimos consejos: el más importante acabar lo que empiezas y no despistarse con ideas nuevas. Sigo empeñado en hacerme un post-doc contigo el día que montes un labo.

Ainhoa, que el primer día que entré pensé que estabas loca. Al poco pude confirmar que estaba en lo cierto. Afortunadamente. Ya quisiéramos muchos esa locura. Por donde pasas irradian algo muy especial, como una luz, y a los que nos toca nos cambia. Cada vez que alguien abre un congelador todavía parece oírse esa risa escandalosa rebotando en el pasillo. Volveremos a encontrarnos, ya verás.

Hassan, digo Paca, ¡digo Dani! Por el arte hasta en la cosa más pequeña que haces. Por las recepciones que ni la Preysler. Porque cuando te pones la piel de insensible y bruto te despellejaría hasta encontrar al Dani virtuoso. Porque hemos convencido a todos de que nos vamos de farranda a Lisboa, y nadie sabe que en realidad nos vamos de retreat (con moscas y todo). Por esos complejos BX-C dibujados en la arena de Caparica... bueno, y por el Finalmente también (y los lazos familiares que ahora nos unen a él). Por ser un amigo con mayúsculas. Por todo lo compartido y reído, pero sobre todo por todo lo que nos vamos a seguir riendo. Aunque te subas por las paredes: ¡terima kasih!

A Javi por todo, así acabamos antes. Por esa forma de ser y de ver la vida que me inspiran a ser mejor y me sirven de ejemplo. Le das valor sólo a las cosas importantes. Porque estarás pensando “que mal están las cosas en España para que se sea yo un ejemplo de algo”. Por llevarnos a tu pueblo y descubrir allí cómo te mimetizas con los lugareños. Por las cosas de viejuno que tienes, que te engrandecen. Por enseñarme a montar en bici. Por no arrollarme con tu bici cuando me caí volviendo a Madrid contigo... Cuando te fuiste dejaste un vacío enorme, pero tienes toda la razón en algo: “volveremos a encontrarnos por el mundo”. Y me parece que muy pronto.

A Lara no le agradezco nada, que se hace la dura. Bueno sí, pero sólo por ser experta en lanzar manzanas a jefes eméritos. Y también porque me encantaba compartir escritorio contigo. Por tantas confesiones y por ilusionarte de verdad cuando fui a Singapur (tarta de cumpleaños incluida). Por la sedación cuando defendiste tu tesis (no descarto hacer lo mismo). Dejaste otro vacío horroroso, pero me pasa como con Javi: sé que nos encontraremos por ahí.

Foronda, artista entre artistas, genio entre genios. Gracias por el arte, la ciencia, las exhibiciones con el quan-*tao* y por las pesadillas que tenías cuando te dormías en mis seminarios. Sobre todo por ese finde en Cazorla que nos regalaste a los del labo. Hay algo muy bonito de ti que se ha quedado flotando en el 424... no, no me refería al póster de Jackie Chan. Se te echa de menos...

“Se abre el telón y se ve a María...”. Porque ya no te acordarás, pero te subiste a bailar a la barra del bar la última noche del primer retreat. Y porque algún día se lo contaré a Bruno (qué perro soy). Por sonreír, siempre. Gracias también a tu “compañero de piso”: ya sabes que yo tampoco le soporto.

Guarner. ¿Se puede ser todavía mas angustias que yo? ¡Por supuesto!. Gracias por la eficiencia, la diligencia (la de los caballos), el marujeo y especialmente por las gafas de Montoro. Por todas las oportunidades que tuviste de descuartizarme por no hacerme del EPIF y nunca consumaste. Porque noto que me tienes un aprecio especial y me tratas con un rasero diferente, pese a lo plasta que soy. Muy bonito. ¡Suerte!

A Jeusillo. ¿Te acuerdas de que entramos a la vez en el labo? Por todo lo que nos pudimos reír los 2 en tu coche a la vuelta del retreat de Asturias. Eres grande por ser siempre tú, siempre tan auténtico. Por demostrar que todas las cosas se pueden hacer de una forma diferente, igual de buena.

A Elise por sencilla, discreta, humilde. Por ese grandísimo corazón que tienes y el gusto que da que la primera cosa que uno vea al entrar en el laboratorio por la mañana sea tu sonrisa. Porque yo sé que en el fondo echas de menos a Berlusconi...

Vero. Por los super-poderes de madre que adquiriste cuando tuviste a Héctor: saber cuando hacíamos algo mal solo con mirarnos, hacer 20 experimentos en paralelo... Por lanzarte sin miedo al mundo de la industria.

Luis, que mete una navaja en el equipaje de mano por lo que pueda pasar y hace unas barbacoas que dan gusto. Lo apostaría todo a que vas a transformar a Suiza en potencia mundial de vóley-playa, así que aplícate y no caigas en la tentación del chocolate fácil. Que tiemblen los suizos: Luis vuelve a la ciencia en activo.

A Jeff, porque te gusta el trabajo bien hecho y hasta que no lo atas todo no paras. Porque el tiempo pasa siempre para bien, y todo mejora.

¡Requena! Porque cuando crees que ya has conocido a suficiente gente maravillosa, va la vida y te presenta a alguien todavía mejor. Por ese minuto y 20 segundos que me sacaste en la carrera del CSIC, que no te perdono. Porque cuando veo que hay alguien todavía mas dejado que yo con los papeles de la universidad me haces sentir un poco mejor. Porque te encanta Vetusta. Por todo lo que le vas a aportar a la gente y a la ciencia. Por ser fuerte (e inspirarnos así a algunos).

<<¡Huye Luna, Luna, Luna! Si vinieran los gitanos harían con tu corazón collares y anillos blancos>> Mira que lo he intentado, pero al pensar en ti solo me vienen a la cabeza Lorca y recuerdos en los que te estás partiendo de risa, sin poder articular palabra. Eso dice mucho de ti. Gracias por la confianza que noto que tienes conmigo.

Paloma. “Meravigliosa creatura”, además del título de una preciosa canción es cómo definió a Marlene Dietrich una de sus amantes, por imprevisible, fascinante, temperamental. No te hace justicia por quedarse corta como definición. Además, a ti no te hace falta ninguna definición, pero déjame que te llame lo mismo. Como el arte, muchos habrá que no entiendan nada de ti. Ni importa. Lo que sí importa es todo lo que has dejado en los que hemos querido conocerte un poquito mejor. Gracias porque sé que al próximo enano que te asalte hablando de chakras le vas a dar una patada en la entrepierna. Y porque eres irrepetible.

A Walter, por no parar de triunfar en la música, por la aventura que es subirse a un coche contigo.

A Inés, que nunca, nunca, nunca pierdes la sonrisa y la amabilidad. Porque has conseguido que ya no me asuste cuando me rascas la espalda a traición.

A “Lomelo”, campeón por goleada en estar siempre de buen humor y positivo, aunque tenga a los dos niños con fiebre. Por la serenidad que transmites, lo aplicado y lo que disfrutas trabajando bien y dando consejos. Hasta te perdono que ahora que me bajo yo a los cafés tu ya no bajas casi nunca.

A Antonio, que guarda por los menos dos copias completas de toda mi colección de stocks, y aun así me sigue pidiendo más. No se si habré estado a la altura siempre que me has pedido ayuda o consejo. Desde luego lo que no aporte yo, lo compensas tú con ese entusiasmo y ese torrente de nuevas ideas y experimentos. Vales mucho, ¡pero baja el ritmo!

Raquel, compañera de fatigas. Por tantísima bondad y dulzura. Porque creo que eres la única persona que me gana en eso de dar mas veces por minuto las gracias por todo. Porque me encanta el cuenta-kilómetros rosa de tu bici. Por las ideas, el ímpetu, la iniciativa. Por tenerme de referencia en temas de ciencia: te lo agradezco, pero ya se te caerá la venda, ya...

En este labo he aprendido a estar en alerta con cada cosa que digo y con los dobles sentidos, pero es que con José lo mejor es relajarse y asumir que te la va a clavar. Gracias por todas las cervezas. Ayyyyyy, si no fuera por aquellos momentos... lo sé, sería por otros.

A Delia, siempre encantadora, siempre optimista. Maestra orfebre de preciosa bisutería. Voluntariosa como nadie, da igual la hora intempestiva de un fin de semana que uno venga al labo, que ella estará en el confocal sin perder la sonrisa. Hija, baja el ritmo tu también.

A Carlos y Miguel, pack indivisible. Uno por enseñar tanto, el otro por aprender tanto. Yo espero que, como dice Sabina, el fin del mundo me pille bailando. Por la forma en la que disfrutáis hablando de noticias apocalípticas de economía y actualidad, igual casi mejor os deseo que a vosotros os pille con un cubo de palomitas y unas gafas 3D.

A Noe, penúltima en entrar es esta jaula de grillos. Por lo bien que has encajado aquí. Por ser tan clara pese a ser gallega, pero luego tenernos haciendo quinielas sobre cómo vas a llamar a tu criatura.

A las últimas adquisiciones de tan ilustre colección: Miguel Ángel, Pablo, Rafael, Miguel (424) y Antonio (424). No os asustéis, que somos mas normales de lo que parecemos. Bueno, igual estoy exagerando...

Al anónimo que dejó el estropajo lleno de un colorante azul igual de anónimo, porque de todo se aprende en esta vida. Y seguro que tú ese día aprendiste muchas más cosas que yo.

A la "Vieja Guardia", porque sois como una leyenda, pero mejor, porque se os puede tocar y ver lo humano. Por tantas historias que hemos oído de vosotros, por la responsabilidad tan grande que es mantener esa llama encendida. Héctor, por el humor insufrible, las charlas de ciencia y ese cariño tan grande que siempre tienes conmigo. Carlos, que aunque te tengo al lado aun no te he conocido lo suficiente, pero sé que un día lo haré. Luisma, grandísima persona, divertida como pocas. Inma, un desparrame de bondad al que le falta tiempo para llevarse a su pueblo.

A toda la gente del departamento en general. No puedo ponerlos a todos aquí, claro, pero sí querría mencionar en especial a la gente con la que, por un motivo u otro, he compartido más complicidad, como Manu (pese a sus dos graves problemas: que es italiana y que le gustan las cosas de Apple), Bea, Álvaro o Richi. Y sería muy injusto que no hiciera una mención muy especial a Ana Busturia, no solo por compartir de forma tan entusiasta stocks, anticuerpos y miles de consejos, sino también por ese increíble sentido del humor. Gracias también a las chicas del SMOC, que ofrecen 3 soluciones y una sonrisa a cada problema.

A Montse Corominas por acogerme en su laboratorio en mi estancia y ser aún mejor persona que científica (que ya es difícil) y a Florenci Serras por compartir tantas charlas sobre la vida y la ciencia. A los 2, gracias por tratarme con tantísimo cariño y abrirme la puerta de vuestras casas y laboratorios. Y por supuesto a toda la gente de sus grupos, ¡que sé yo que van a leer esto!: Andrea, Marina, Natalia, Alber, Isabel, Francesca, Xavi (te conocí sólo 2 días pero me caíste muy bien), Ada (no entonces, pero te conocí después)... ¿me dejo a alguien? Sí: a Silvia,

por ser tan maja y buena maestra haciendo ChIPs y a Cora, que descubrimos que habíamos llevado vidas paralelas sin saberlo. De todo corazón gracias: conseguisteis que de los casi 3 meses que estuve allí no me sintiera sólo ni un día.

A Jordi, por estar siempre dispuesto a venir a nuestros retreats, por preguntarnos y aconsejarnos sobre nuestros trabajos, por el humor. Gracias por estar tan pendiente de mí cuando estuve en Barcelona. A Marco Milán también por preocuparse por mí, por los mil consejos, los vaciles y las cañas.

A Jaime Renart que fue mi tutor en el proyecto de fin de carrera y con el que empecé este oficio de la ciencia. Gracias por los consejos, la ayuda y lo humano que eres. A Rafael Garesse y a Miguel Fernández que me dejaron su laboratorio para trabajar con moscas y me ayudaron en todo lo que pudieron. A toda la gente de su laboratorio, especialmente a Álvaro por buena persona y que no deja de sorprenderme lo que se parece a mí en tantas cosas. A Miguel Quintanilla por estar siempre disponible para resolver mis torpes dudas.

A mis amigos de la facultad: Ale, que como también trabaja en desarrollo es la única que me entiende. Porque ya no me dejas que me volatilice en las manifestaciones y por aprender contigo tanto del arte prerrománico en Italia. Por enseñarnos a hacer ciencia low-cost. Mario, tan discreto que hay gente que ni se da cuenta de que estabas ahí. Por saber de tanto y nunca presumir de ello. Por buena persona. Porque Talavera debería ser la capital de España. David, mi taxónomo de cabecera que comparte inquietudes vitales y gustos musicales conmigo. Gracias por aquel finde en Soria de muestreo, con control de la Guardia Civil incluido (y nosotros con el maletero lleno de plantas). Laura, que siempre tienes mil historias que contarnos, siempre con buen humor y un aspecto estupendo aunque estés cansada o estresada. Ara, por el optimismo, la alegría, los postres y las pompas de pan. Tu tesis va a ser la única que va a ayudar a la humanidad de verdad, ya lo sabes. Javi, por ese humor ácido, por las risas, por ponerle nombres de personas a las cosas (como las casas de cada uno), por ser el monitor del Jardín Botánico más guay. Y a Belén, por entrañable, que ni fue compañera ni tampoco mi profesora, pero me hizo descubrir lo durísimo y divertido que es un muestreo en un río. Vuelvo a raspar piedras cuando haga falta.

A toda la gente con la que he compartido cursos y proyectos teatrales, porque habéis sido una válvula de escape y otro camino para realizarme como persona. A Gus, por ser el mejor profe de teatro del mundo, por tenerme de enchufado en clase (por una vez en algo entro por enchufe) y porque para colmo es un gran amigo.

A toda mi familia, que aunque esté dispersa por el mundo siempre será la de Granada. Porque igual no os veo mucho, pero sé que pase lo que pase vais a estar ahí. A mis abuelos M^a Josefa y Manuel, por esos veranos maravillosos en El Padul. Por esas comidas tan riquísimas con los granos de pimienta enteros. Por las tardes en “la cuadrilla” leyendo novelillas de 25 pesetas de ciencia-ficción y del oeste. Por las tertulias nocturnas y las partidas de cartas, con ese olor del galán de noche. Qué pena que ahora, que soy mayor y podría apreciaros más, no pueda preguntaros por tantísimas cosas. Aunque os perdí pronto sois una referencia para mí, y esta tesis también es para vosotros.

A mi bro, JM, J.Ma, “yei-ma”, ¡Toruk!, lo que prefieras. Por haber sido ese hermano mayor al que me quería parecer desde que era un canijo. Porque podemos pasarnos horas hablando de las cosas nos gustan. Porque también podemos pasarnos horas sentados el uno al lado del otro sin hablar y aun así habérmolo dicho todo. Porque ya antes de que nos miremos a los ojos sabemos cómo está el otro. Porque en el fondo siempre me encantaba que me ganaras a las chapas, a los gogos, en el Tente, o al Guild Wars. Por todo lo que ya eres, pero mucho, muchísimo más por todo lo que puedes hacer y vas a ser: gracias.

A mi madre, que tiene sueños bellos, que los cree posibles. Eres un ejemplo para cualquiera, y sobre todo para mí, de cómo hay que luchar en la vida por los sueños de uno. Y de cómo al final siempre, por duro que haya sido el camino, los puedes materializar. Una máxima de mi forma de ser es pasar por la vida intentando no deber-

le nada a nadie, lo menos posible. Pero si hay alguien a quien debo todo lo que soy ahora o todo lo que pueda ser es solamente a ti. Y esa deuda no es ninguna carga, es un orgullo que puedo mostrar a todos, la deuda más bella.

Deuda, soñar, belleza... vaya, he vuelto a las mismas 3 palabras del comienzo... Sueños que deben ser bellos.

Gracias a todos.

Nos vemos en los bares.

ANEXO III: PUBLICACIONES

Durante el periodo de desarrollo de la tesis, el doctorando ha publicado los siguientes artículos, que no han formado parte del manuscrito de esta tesis:

- Martin, F. A., Herrera, S. C. and Morata, G. (2009) 'Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development* 136(22): 3747-56.
- Morata, G. and Herrera, S. C. (2010) 'Differential division rates and size control in the wing disc', *Fly* 4(3).



Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc

Francisco A. Martín^{*,†}, Salvador C. Herrera^{*} and Ginés Morata[‡]

We report here experiments aimed at understanding the connections between cell competition and growth in the *Drosophila* wing disc. The principal assay has been to generate discs containing marked cells that proliferate at different rates and to study their interactions and their contribution to the final structure. It is known that single clones of fast-dividing cells within a compartment may occupy the larger part of the compartment without affecting its size. This has suggested the existence of interactions involving cell competition between fast- and slow-dividing cells directed to accommodate the contribution of each cell to the final compartment. Here we show that indeed fast-dividing cells can outcompete slow-dividing ones in their proximity. However, we argue that this elimination is of little consequence because preventing apoptosis, and therefore cell competition, in those compartments does not affect the size of the clones or the size of the compartments. Our experiments indicate that cells within a compartment proliferate autonomously at their own rate. The contribution of each cell to the compartment is exclusively determined by its division rate within the frame of a size control mechanism that stops growth once the compartment has reached the final arresting size. This is supported by a computer simulation of the contribution of individual fast clones growing within a population of slower dividing cells and without interacting with them. The values predicted by the simulation are very close to those obtained experimentally.

KEY WORDS: Wing disc, Cell competition, Growth control, Apoptosis, *Drosophila*

INTRODUCTION

The *Drosophila* imaginal discs have become a very convenient model to study developmental problems. Isolated from most larval tissues and floating in the haemolymph, they are cell populations that grow autonomously and constitute a well-delimited developmental system. Many of their growth parameters, initial and final number of cells, length of the proliferation period, cell division rate, etc. are known after many years of studies (James and Bryant, 1981; Bryant and Simpson, 1984; Madhavan and Schneiderman, 1977). A principal feature of all imaginal discs is the subdivision into anterior (A) and posterior (P) compartments (García-Bellido et al., 1973).

The phenomenon of cell competition was discovered in the wing disc (Morata and Ripoll, 1975). The experiments involved the use of mutations at the *Minute* genes, which encode for ribosomal proteins (Marygold et al., 2007). Heterozygous (*M/+*) flies are viable and fertile and have normal morphology, but suffer a developmental delay in comparison with non-*Minute* (*M⁺*) flies. The key observation that led to the concept of cell competition was that despite the normal viability of *M/+* flies, clones of *M/+* cells were eliminated when generated in *M⁺* discs. Thus slow-dividing but otherwise viable cells were somehow outcompeted by faster dividing cells. Later work (Moreno et al., 2002) established that slow-dividing cells were eliminated by apoptosis mediated by the Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. A key feature of cell

competition is that it is a context-dependant phenomenon; it originates from specific interactions between two types of viable cells and leads to apoptosis in one of them.

The phenomenon of cell competition is not limited to the elimination of slow-dividing *M/+* cells. Viable cells with low activity in the insulin pathway are also eliminated (Bohni et al., 1999). Similarly, cells expressing low levels of *dMyc* (the *Drosophila* homologue of the mammalian proto-oncogene *Myc*) are also outcompeted by cells with higher levels (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004).

Although cell competition has been studied in detail only in *Drosophila*, it may occur in vertebrates. Mouse cells heterozygous for a riboprotein gene divide slower and are apparently outcompeted by cells with two doses of the gene (Oliver et al., 2004). Furthermore, during rat liver reconstitution hepatic stem cells repopulate the tissue by a process akin to cell competition (Oertel et al., 2006).

The functional significance of cell competition in *Drosophila* is not yet clear. Obviously, the elimination of weaker or slow-dividing cells within an imaginal disc may contribute to the general fitness of the disc. The ability of fast-dividing cells to eliminate slow ones has suggested that cell competition may be a relevant factor in the colonisation of tissues by tumorous cells (Perez-Garijo et al., 2005; Moreno and Basler, 2004; Moreno, 2007).

Another role of cell competition appears to be size regulation; reducing apoptosis in the wing disc results in adult wings of variable size (de la Cova et al., 2004). Moreover, a potential role of cell competition in size control stands from the analysis of *M⁺* clones generated in *M/+* discs. These clones do not cross compartment boundaries, but as their cells divide faster than surrounding ones the descendants of a single cell can occupy large portions, often more than 50%, of their compartment, without affecting compartment size. The study of these overgrowing *M⁺* clones may be useful to analyse the process of size control, because the presence of fast-dividing cells is forcing the control mechanism, which has to cope with cells

Centro de Biología Molecular CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

^{*}These authors contributed equally to this work

[†]Present address: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

[‡]Author for correspondence (gmorata@cbm.uam.es)

with very different division rates. This is unlike the normal situation, in which all the cells divide roughly at the same rate (González-Gaitán et al., 1994; Milán et al., 1996).

One interpretation of this observation is that the presence of the fast-growing M^+ clones affects $M/+$ cells, which are eliminated in order to build a compartment of normal size: as the M^+ clone grows its cells interact successively with neighbour $M/+$ cells and induce apoptosis in them. The end result of this process would be a compartment of normal size composed of a majority of M^+ cells, just as observed. Recent results have provided some support for this view: overgrowing M^+ clones can induce apoptosis in $M/+$ cells close to their borders (Li and Baker, 2007) (see also Fig. 1).

A related question comes to bear on the mechanism by which M^+ clones overgrow. In the normal situation an M^+ clone induced early in development in an M^+ disc reaches a maximal size of 10^3 cells (García-Bellido and Merriam, 1971), whereas in an $M/+$ disc it often reaches more than 10^4 cells. Li and Baker reported that when cell competition is reduced the degree of overgrowth of the M^+ clones is also reduced: M^+ clones generated in compartments in which cell death is blocked with the caspase inhibitor P35 are smaller than similar clones in control compartments (Li and Baker, 2007). Another way to compromise cell competition is by mutations in the engulfment genes, which are required for the process: when M^+ clones are mutant for some of these genes the degree of their overgrowth is also reduced (Li and Baker, 2007).

In this paper we address the two questions defined above: the role of cell competition in the control of size of the wing disc, and the mechanism of overgrowth of the M^+ clones. Our results show that cell competition has no major role in size control, as compartment size is not altered in the absence of apoptosis, even in the presence of overgrowing M^+ clones. Our findings also show that the overgrowth of M^+ clones does not depend on the killing of neighbouring $M/+$ cells but is the sole consequence of their higher division rate. Computer simulations made on the assumption that $M/+$ and M^+ cells proliferate independently at

their own rates make predictions that fit very well with the observed experimental data.

Finally, the results presented in this report provide further evidence for a mechanism of size regulation that functions at the compartment level and that can integrate cells with very different proliferation rates.

MATERIALS AND METHODS

Fly strains and immunohistochemistry

The fly stocks used were obtained from the Bloomington Stock Center except where indicated: yw hsFlp; $RpS17^-$ ubi-GFP $P(w^+ FRT2A)$, $RpS17^-$ ubi-GFP $P(neo^+ FRT80B)$, yw hsFlp; ub-GFP $P(w^+ FRT2A)$, yw Flp; mwh $P(w^+ FRT2A)$, yw hsFlp; mwh $P(neo^+ FRT80B)$, yw hsFlp; $act>y+>Gal4,UAS-GFP$, $en-Gal4$, $UAS-Diap1$, $UAS-RNAi-Dronc$ (VDRC), $UAS-p35$, $Histone2-RFF$, $hh-Gal4$ (a gift of T. Tabata, Laboratory of Morphogenesis, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Japan), $UAS-GFP$ and $drp^{\Delta 5}$ $P(neo^+ FRT80B)$ (gift of N. Baker, Department of Genetics, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA).

Fixation and immunohistochemistry were carried out as described in *Drosophila* protocols. The following antibodies and dilutions were used: phospho-histone 3, 1:400 (Cell Signaling Technology); mouse anti-En 1:50 (Hybridoma Center); rabbit anti-phosphorylated Mad, 1:2000; guinea pig anti-brk 1:1000; rabbit anti-cleaved Caspase 3, 1:50 (Cell Signaling Technology); To-Pro-3, 1:1000 (Invitrogen); rabbit anti-p35, 1:5000 (StrataGene); rabbit anti-dMyc, 1:1000; rabbit anti-Yki 1:1000 (Dong et al., 2007), guinea pig anti-Mer and Ex, 1:2000 (R. Fehon), rabbit anti-dronc1:2000 (Ryoo et al., 2004), rabbit anti-diap1 1:1000 (Wilson et al., 2002). Secondary antibodies were purchased from Invitrogen.

The TdT-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay was performed as described (Udan et al., 2003). Images were taken with Leica TCS SPE and Zeiss LSM510 confocal microscopes.

Induction of M^+ clones

For clones induced 24–40 hours after egg laying (AEL) the heat shock treatment (37°C) was 20 minutes (M^+ clones in M^+ larvae, control clones) and 9 minutes (M^+ clones in $M/+$ larvae). For clones induced 48 hours before puparium formation (BPF), the heat shock was 13 minutes (control

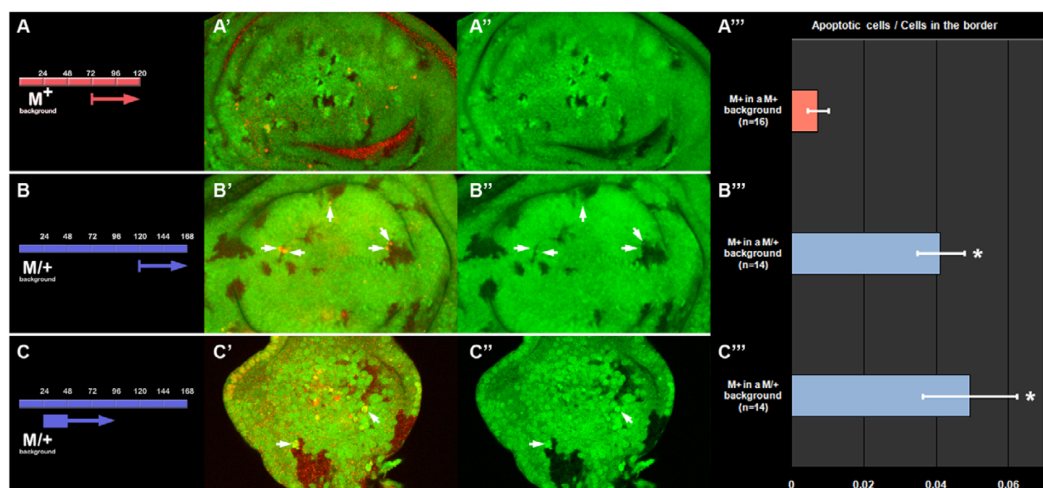


Fig. 1. Cell competition in the border of M^+ clones. (A–A'') M^+ clones growing in an M^+ background 48 hours after clone initiation in third instar discs. (B–B'') M^+ clones growing in $M/+$ third instar discs 48 hours after clone initiation. (C–C'') M^+ clones growing in $M/+$ second instar discs. The left column illustrates, by arrows, the times of clone induction (base of the arrow) and disc fixation (tip of the arrow) with reference to developmental time. The second and third columns show apoptotic cells (red) in discs with clones. The fourth column shows the average frequency of apoptotic cells in the vicinity of M^+ clones. Error bars indicate s.e. *, $P < 0.01$.

clones, M^+ in M^+ discs) and 5 minutes (M^+ in $M/+$ discs). For clones induced 72 hours BPF, the heat shocks were 15 and 7 minutes, respectively.

The following genotypes were used. M^+ clones: *yw**hsFlp*; *en-Gal4*; *RpS17⁺ ubi-GFP* *P(w⁺ FRT2A)/mwh jv P(w⁺ FRT2A)*. Control clones: *yw**hsFlp*; *en-Gal4*; *ubi-GFP* *P(w⁺ FRT2A)/mwh jv P(w⁺ FRT2A)*. M^+ clones + *diap1*: *yw**hsFlp*; *en-gal4/UAS-diap1*; *RpS17⁺ ubi-GFP* *P(w⁺ FRT2A)/mwh jv P(w⁺ FRT2A)*. M^+ clones + *p35*: *yw**hsFlp*; *en-Gal4/UAS-p35*; *RpS17⁺ ubi-GFP* *P(w⁺ FRT2A)/mwh jv P(w⁺ FRT2A)*. M^+ clones + *dronc^{RNAi}*: *yw**hsFlp*; *en-gal4/UAS-dronc^{RNAi}*; *RpS17⁺ ubi-GFP* *P(w⁺ FRT2A)/mwh jv P(w⁺ FRT2A)*. M^+ *drpr^{AS}* clones: *yw**hsFlp*; *drpr^{AS}* *P(neo⁺ FRT80B)/RpS17⁺ ubi-GFP* *P(neo⁺ FRT80B)*.

Counting cell number in the wing disc

Larvae from the genotype *UAS-GFP*; *hh-Gal4/Histone2-RFP* were dissected at prepupal stage, and the discs mounted without coverslip to avoid deformation. Confocal sections per disc were carried out with a Leica TCS SPE microscope separated by 0.6 μ m. Images were processed using SVI Huygens Deconvolution and Metamorph software (Molecular Devices) to allow manual counting.

Clone measurements and growth parameters

In clones induced 48 hours BPF, cell number was determined by counting the number of nuclei (positive for To-Pro3) with Photoshop CS3 software (Adobe). In clones induced 24–40 hours AEL, the size (in percentage) is referred to the total compartment size measured in pixels by using WCIF ImageJ software. To measure clone size in adult wings we counted directly the number of *mwh* trichomes of the clones in the wing blade and assumed clone size to be the same in areas in which *mwh* cannot be scored.

Cell doubling times (CDT) in each period of larval development was calculated using the formula $CDT = (\text{time after heat shock}) / \log_2 N$. For a detailed scheme of clone inductions, see Fig. S3 in the supplementary material. To assess the CDT in wild-type and $M/+$ wing discs, we dissected discs from larva with the following genotypes: *yw**hsFlp*; *act>y⁺>Gal4, UAS-GFP*; *mwh P(neo⁺ FRT80B)/mwh P(neo⁺ FRT80B)* and *yw* *hsFlp*; *act>y⁺>Gal4, UAS-GFP*; *sc², RpS17⁺ P(w⁺ FRT2A)/mwh P(neo⁺ FRT80B)*, respectively.

Computer simulation

The simulation uses a logistic mathematical function based in the CDT of wild-type and *Minute* cells previously obtained. The programming language was BASIC (DarkBasic Software). The growth parameters, final compartment and primordium sizes were implemented into the program. The growth function assigns a different CDT to daughter cells after each division. The length of the CDT depends on the developmental timing, which is a function of the current number of cells and of the remaining cells needed to reach the final size, as imposed by the logistic function. In the wing disc, cell division is asynchronous, and this fact is reflected in the program. For additional information, see the supplementary appendix. The program can be downloaded from the webpage: <http://bacterio.cbm.uam.es:8080/scherrera/simulations.zip>.

RESULTS

Cell competition, overgrowth of M^+ clones and compartment size control

We investigated the connection between cell competition and the growth of compartment in the wing disc. More specifically, we performed experiments addressed to: (1) measure the ability of M^+ clones to induce apoptosis of $M/+$ cells; (2) compare the growth rate of M^+ clones when they grow in $M/+$ and in M^+ discs, and in conditions in which cell competition is prevented; and (3) test whether the cell competition triggered by the M^+ clones has a significant role in the mechanism of compartment size control.

Induction of apoptosis by M^+ clones in $M/+$ discs

Early third instar $M/+$ and M^+ larvae (see Materials and methods) were heat shocked to generate M^+ clones. We frequently found apoptotic $M/+$ cells near the border of clones (Fig. 1B',C'),

suggesting that there is elimination of $M/+$ cells by cell competition. To ascertain that this apoptosis was actually due to cell competition we compared the number of apoptotic cells at the borders of M^+ clones growing in $M/+$ and in M^+ discs. The latter constitute the control experiment, as in those discs the M^+ clones cannot induce cell competition. We measured the amount of apoptosis in the border of M^+ clones in prepupal discs and also in discs from early third stage larvae. This was because there was the possibility that the amount of cell competition and therefore of apoptosis could be greater in early development, when the cell division rates are higher. As shown in Fig. 1A''',B''',C''' there was a 5- to 6-fold increase in the number of apoptotic cells close to M^+ clones in $M/+$ discs compared with the control. The amount of apoptosis in early discs was not significantly different in discs from different ages. These results provide evidence for cell competition in the borders of the M^+ clones, in support of the previous observation by Li and Baker (Li and Baker, 2007). However, as also indicated in the figure, the number of outcompeted cells appears to be small; only one in 20–24 cells near the clone border showed caspase activity.

We analysed the possible factors behind these events of cell competition by comparing in $M/+$ and M^+ cells the activity levels of pathways involved in disc growth: the Dpp/Brk gradient (Moreno et al., 2002), the Hpo/Warts pathway (Tyler et al., 2007) and the dMyc gene (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004). Detailed information about these experiments is provided in Fig. S1 in the supplementary material. The result is that we did not detect differences in the levels of these pathways in M^+ and $M/+$ cells.

Growth of M^+ clones in M^+ and $M/+$ discs and in absence of cell competition

Next we measured the growth rate of M^+ clones developing in M^+ and in $M/+$ discs. In these experiments the discs were fixed 48 and 72 hours after clone initiation. The results are illustrated in Fig. 2: the M^+ clones appear to be of the same size whether they grew in an $M/+$ or in an M^+ disc (Fig. 2B,C,H–J). Thus M^+ clones developing in $M/+$ discs grew at the same rate as in an M^+ background. We also measured the sizes of clones in adult wings. For these experiments we heat shocked M^+ and in $M/+$ larvae of various ages. The larvae that reached the prepupal stage (spiracles had been released) after 24±2 and 48±2 hours were separated and allowed to pupate. The wings of the adults that emerged were inspected for *mwh* clones. The data on clone size are included in Fig. S2 in the supplementary material. The size of the 24-hour clones were the same in M^+ and in $M/+$ wings, whereas in the 48-hour series those growing in $M/+$ wings were slightly larger. Possibly this difference may be due to a longer pupal period in $M/+$ larvae that allows M^+ clones some extra time. Taken together, these are significant results, for they suggest that M^+ clones grow independently of interactions with neighbouring $M/+$ cells – that is, independent of cell competition.

To explore this idea further, we measured the growth of M^+ clones in compartments in which apoptosis is abolished or greatly reduced. We used the Gal4/UAS method to force expression of several anti-apoptotic factors: the gene *diap1* (*thread* – FlyBase) (Wilson et al., 2002), an RNAi of the apoptotic gene *dronc* (*Nedd2-like caspase* – FlyBase), and the baculovirus p35 gene, which blocks effector caspase activity (Hay et al., 1994). The *en-Gal4* line allows controlled expression of these factors in the posterior compartment, leaving the anterior compartment as control. As shown in Fig. 2, apoptosis, and hence cell competition, was largely abolished in the posterior compartments that contained the *UAS-diap1*, the *UAS-dronc^{RNAi}* or the *UAS-p35* construct.

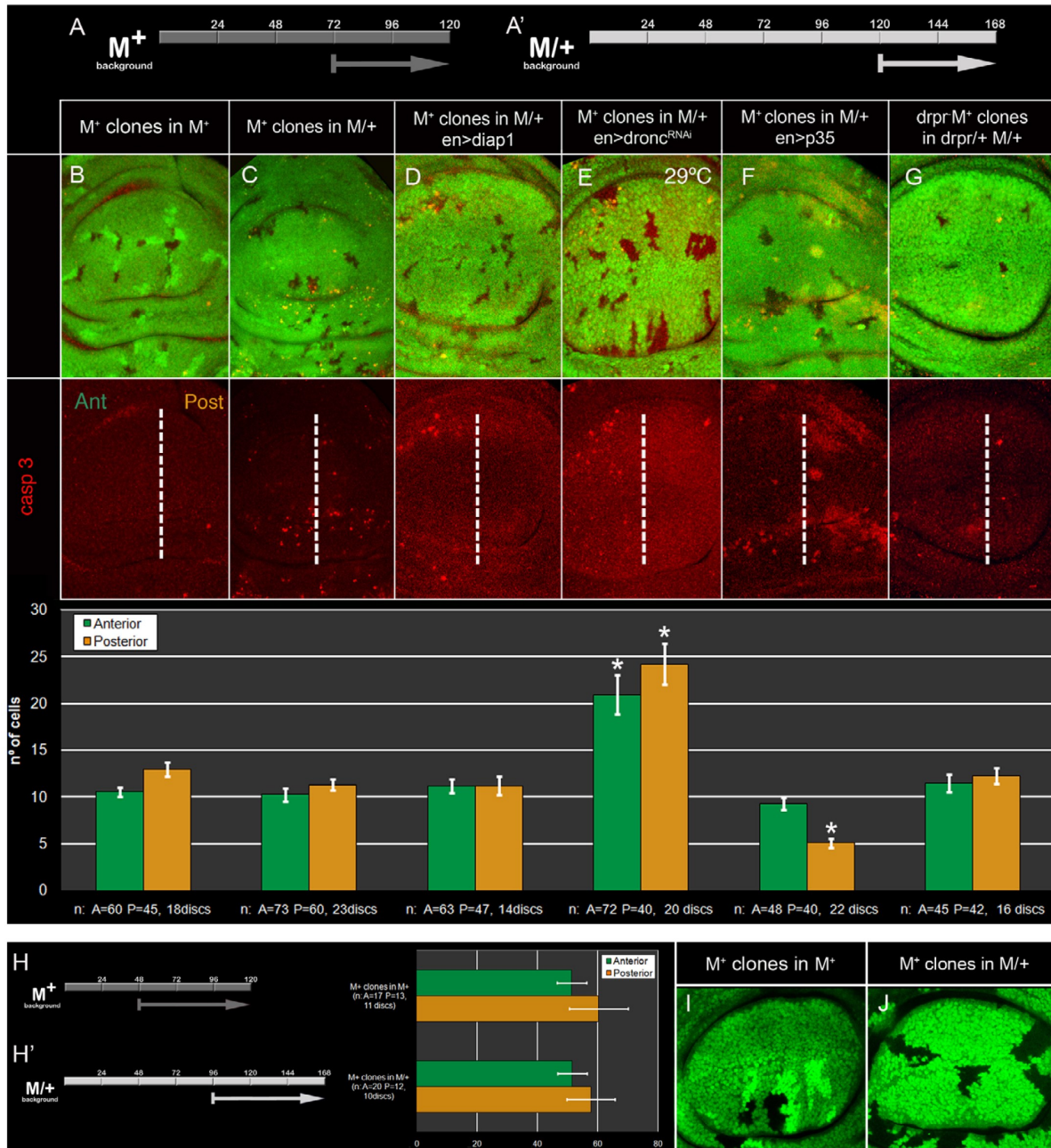


Fig. 2. Size of M^+ clones 48 and 72 hours after clone initiation in different backgrounds. (A,A') The time of clone initiation and disc fixation in M^+ and $M/+$ discs, respectively, in the 48 BFP clones. (B-G) The different genotypes: (B) M^+ clones growing in M^+ discs; (C) M^+ clones growing in $M/+$ discs; (D) M^+ clones growing in $M/+$ *en>diap1* discs; (E) M^+ clones growing in $M/+$ *en>dronc^{RNAi}* discs; (F) M^+ clones growing in $M/+$ *en>p35* discs; (G) *drpr⁺* M^+ clones growing in *drpr⁺* $M/+$ discs. The top row shows discs with clones. The middle row shows caspase activity in the same discs as in the top row. Note that there is very little apoptosis in B and that in the C-E columns the apoptotic cells are frequently associated with the clone borders. In the posterior compartments of the discs in D and E columns, there is very little apoptosis associated with the M^+ clones. In column G, apoptosis is much reduced in both the anterior and the posterior compartments. The bottom row shows the average size of clones in the A compartment (green) and in the P compartment (orange). The number of clones in the A and P compartments and the number of discs examined are also shown. (H,H') Induction of 72 hours BFP clones in M^+ and $M/+$ discs. The average sizes of the clones are shown to the right of the panel. (I,J) Examples of M^+ clones in M^+ and $M/+$ discs. Error bars represent s.e. *, $P < 0.01$.

We also interfered with cell competition by examining M^+ clones that are defective in engulfment gene activity. It has been shown that the interactions between ‘winner’ and ‘loser’ cells leading to cell competition require activation of engulfment genes in the winner cells (Li and Baker, 2007). Mutations at *draper* (*drpr*) appear to be effective in reducing cell competition: M^+ *drpr*⁻ clones are much less able to outcompete M^+ cells than are M^+ *drpr*⁺ clones. In our experiments we also found a reduction in the amount of competition in the borders of M^+ *drpr*⁻ clones: whereas in M^+ *drpr*⁺ clones there was an average of one apoptotic cell in 24 in the clone borders, in M^+ *drpr*⁻ clones there was one in 55. In the control (M^+ clones growing in M^+ discs) the number of apoptotic cells in the border was one in 143.

The results concerning the effect of apoptosis inhibition on the growth of M^+ clones are illustrated in Fig. 2D-G: the size of M^+ clones in posterior compartments of genotype *en>diap1* (Fig. 2D) or *en>dronc^{RNAi}* (Fig. 2E) was the same as in anterior compartments. The overall clone size (in anterior and posterior compartments) in the *en>dronc^{RNAi}* experiment was higher because the larvae were kept at 29°C to obtain a more effective reduction of *dronc* activity. Because the discs were fixed 48 hours after clone initiation, as in the other experiments, this resulted in bigger clone size. In the case of the *drpr*⁻ experiment (Fig. 2G) the M^+ clones were of the same average size as M^+ *drpr*⁺ clones (Fig. 2C). We found a significant size difference only in *en>p35* discs, in which M^+ clone size was smaller in the posterior than in the anterior compartments (Fig. 2F). This result is in agreement with the previous observation by Li and Baker (Li and Baker, 2007) and is discussed below.

The preceding results (except those from of the *en>p35* experiment) suggest that the growth of M^+ clones is not significantly affected by their ability to outcompete neighbouring M^+ cells. However, the clones generated in the previous experiment were relatively small and grew only during a limited period of time. We then checked whether early M^+ clones, which occupy very large portions of the compartment, make use of this ability for their overgrowth.

A precise estimate of the average contribution of single early M^+ clones was lacking. To address this question we generated early M^+ clones (24-40 hours AEL). As the first divisions start at about 40

hours (Madhavan and Schneiderman, 1977), these clones should appear after the first division. The larvae were given a short heat shock (9 minutes) in order to have a low frequency of clones and thus to avoid having more than one clone per compartment. Under these conditions there is an average of 0.5 clones per disc. The results are shown in Fig. 3. For M^+ clones growing in M^+ compartments the average size was around 3-4% of the respective compartment (Fig. 3B,C), whereas M^+ clones in M^+ compartments occupied an average of 48% in the anterior and 53% in the posterior compartment (Fig. 3B,C). In these experiments the M^+ clones growing in M^+ discs were much bigger than those growing in M^+ discs, in spite of having a similar proliferation rate, because the length of the proliferation period is longer in M^+ larvae.

If the overgrowth of the M^+ clones occurs at the expense of the elimination of M^+ cells it would be expected that the absence of apoptosis should make these clones smaller. As indicated in Fig. 3, the mean size of M^+ clones in the anterior compartments – where apoptosis is not compromised – is the same as in the posterior compartments. This result does not support the argument that M^+ clones overgrow due to elimination of M^+ cells. We found a difference in clone size between the anterior and posterior compartment only when cell death was blocked with P35 in which posterior M^+ clones were smaller than those in the anterior compartment. Although we do not have a clear explanation for this difference, in *en>p35* experiments the last step of apoptosis, that is, the function of the effector caspase Drice (Ice – FlyBase), was blocked (Hay et al., 1994). Under these conditions the M^+ ; p35 cells that initiate apoptosis become ‘undead’ cells, which emit mitogenic signals such as Dpp and Wg (Huh et al., 2004; Pérez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004) (Fig. 4D-D’). In the experiments interfering with apoptosis by overexpressing *diap1* or inhibiting *dronc*, undead cells were not produced because they require normal activity of *dronc* and subsequent inhibition of *drice* function (Kondo et al., 2006; Martín et al., 2008). This ectopic signalling may promote proliferation of nearby M^+ cells, which may provide a larger contribution to the final compartment. Interestingly, the posterior compartments containing p35 were bigger than those without it (Fig. 4B), probably the result of the ectopic signalling generated by the undead cells.

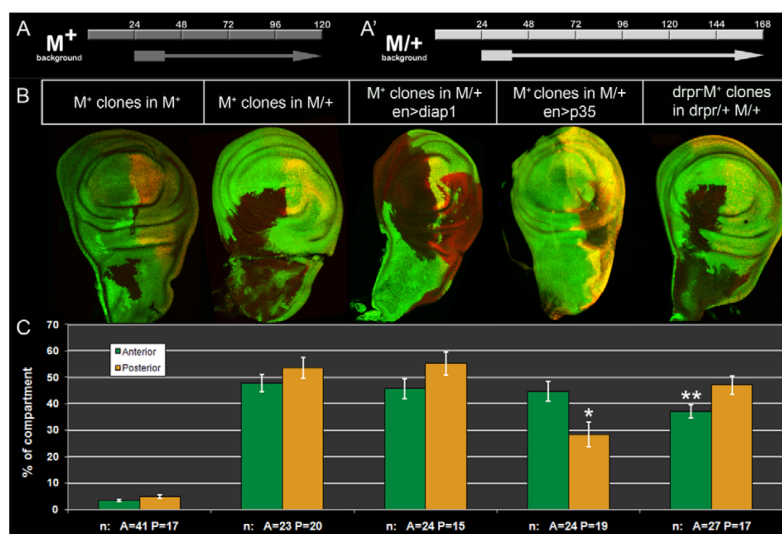


Fig. 3. Average size of individual early M^+ clones in different genotypes. (A,A') The time of clone initiation and disc fixation in M^+ (A) and M^+ (A') discs. **(B)** Discs with unique clones labelled by the loss of GFP. The genotype of the clones is indicated above the discs. Posterior compartments are labelled in red with anti-Engrailed, except the M^+ *en>diap1* disc, which is stained with anti-Diap1, and M^+ *en>p35*, which is stained with anti-P35. **(C)** The average clone size. The number of clones studied for each genotype in the A and P compartment is indicated. Error bars indicate s.e. * , P<0.01; ** , P<0.05.

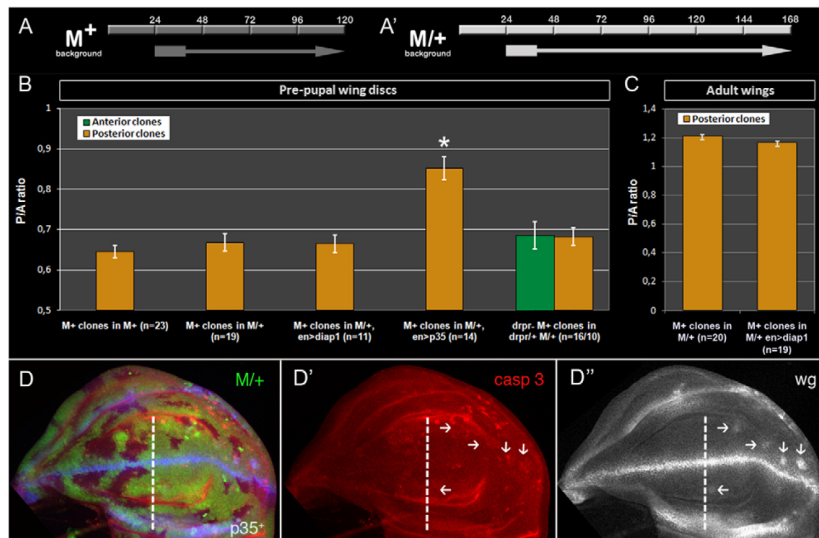


Fig. 4. Relative size of posterior compartments containing M^+ clones. (A,A') The time of clone initiation and disc fixation in M^+ (A) and $M/+$ (A') discs. (B) P/A ratio of wing discs of various genotypes (indicated below the bars) containing M^+ clones in the posterior compartment. There is no significant difference in the ratio except in the case of M^+ clones in posterior compartments containing the *p35* gene. (C) P/A ratio measured in control and *en>diap1* adult wings. (D-D'') The wing pouch region of an *en>p35* disc containing M^+ clones. Note the presence of cells ectopically expressing the *wg* gene, which probably causes additional growth in the compartment. Error bars indicate s.e. *, $P < 0.01$.

Role of cell competition in the control of compartment size

The observation that M^+ clones often induce apoptosis in neighbouring $M/+$ cells may suggest that cell competition could act to eliminate the excess of cells that would be produced in compartments containing overgrowing M^+ clones. It follows from this argument that the abolition of apoptosis, and hence of cell competition, in $M/+$ compartments harbouring early M^+ clones should produce an excess of growth due to the contribution of the rescued $M/+$ cells.

We checked this possibility by measuring the P/A size ratio of discs and also adult wings in which the apoptosis-inhibited posterior compartments contain early M^+ clones. We also measured the size of *drpr*⁻ mutant discs in which cell competition is compromised. In discs of genotype *en>diap1* the P/A size ratio was normal, just like in the wild type; in mature discs it was 0.66, whereas in adult wings it was 1.16 (Fig. 4B,C). The different values of P/A in discs and adult wings derive from the method used to estimate them. For the discs we considered the whole structure, whereas for the adult wings we measured only the wing blade, in which the anterior and posterior compartments are of roughly the same size.

Similarly, the P/A size ratio of *drpr*⁻ discs containing M^+ clones only in the anterior or only in the posterior compartment (Fig. 4B) was also like that in wild-type discs. The only departure from the normal situation is the genotype *en>p35*, in which the P/A ratio was significantly increased. We believe this is because of the presence of ectopic signalling by undead cells (Fig. 4D-D'').

The clear conclusion from these experiments is that under these conditions cell competition does not play a significant role in size control. These results also illustrate that fact that the size control mechanism can cope with very different cell proliferation rates within a compartment: it functions equally well in compartments in which all the cells divide at the same rate, the normal situation, or in compartments in which M^+ clones occupy most of it.

A computer simulation of the growth of M^+ clones

All the preceding results suggest that in the wing disc clones with different division rates grow autonomously; their contribution to the final structure is exclusively determined by their growth rate. The

overgrowth of M^+ clones would simply be due to their higher growth rate, without having to invoke interactions between M^+ and $M/+$ cells. The only limitation would be that the final size of the compartment is fixed, as imposed by the control mechanism. If the contribution of the M^+ and $M/+$ cells in a mosaic disc were the automatic result of their respective growth rates, it should be possible to build a computer simulation that mimics the experimental results.

Basic growth parameters of M^+ and $M/+$ discs

For the simulation it was necessary to ascertain the basic growth parameters of M^+ and $M/+$ wing discs. In particular, the cell proliferation rate (as indicated by the CDT) at different developmental periods, and the initial and final number of cells.

We addressed the first question by inducing in M^+ and $M/+$ larvae Flp-out clones marked with GFP (see Materials and methods) at defined developmental stages and fixing the discs at precise times after clone initiation. For M^+ larvae we considered the 40-72, 72-96 and 96-120 periods and for $M/+$ the 40-72, 72-96, 96-120, 120-144 and 144-168 periods (Fig. 5A and see Fig. S3A,B in the supplementary material). To have precise timing of the clones, the egg-laying periods were very short, 2-4 hours, and the heat shock was 7 minutes (to avoid having too many clones per compartment that may cause merging). The heat shocks were administered to larvae of 40, 72 and 96 hours of age for M^+ , and 40, 72, 96, 120 and 144 hours for the $M/+$. The discs were fixed at various times after the heat shock (see Fig. S3A in the supplementary material).

We found that in early M^+ discs (40-72 hours AEL) the initial CDT was about 5.5-5.7 hours. This value increased as larval development proceeded up to a value of about 30 hours in the last division, just before pupariation (Fig. 5A and see Fig. S3A,B in the supplementary material). The total number of cell divisions was about 9.1, which is in agreement with previous data (García-Bellido and Merriam, 1971). In early $M/+$ discs (40-72 hours AEL) the initial parameters were quite different, with a CDT of 11 hours, whereas the last division took about 35 hours. The greater difference in cell division rate between M^+ and $M/+$ discs appears to occur during the early proliferation phase.

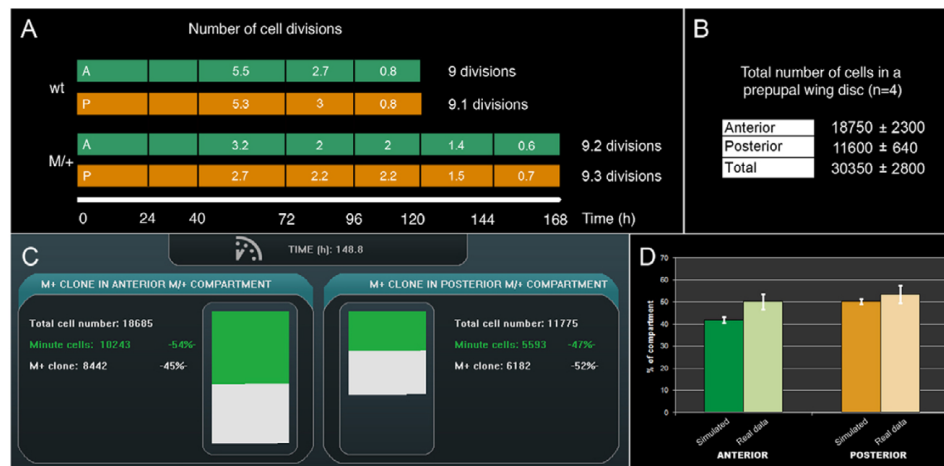


Fig. 5. Proliferation rate during development, final number of cells and results of the computer simulation. (A) The number of divisions performed in 24-hour periods during the proliferation phase of disc development in wild-type and *M/+* larvae in anterior (green) and posterior (orange) compartments. Note that the majority of divisions take place during early disc development. (B) Estimates of the final cell population in the anterior and the posterior compartment. For details of the calculation, see Fig. S3 in the supplementary material. (C) Illustration of single simulation events in the anterior and posterior compartments. (D) Comparison of the average sizes of clones in the anterior and posterior compartment as predicted by the computer simulation and as obtained in real experiments. Error bars indicate s.e. In all cases, $P > 0.05$.

The initial number of cells in the wing disc was measured by Madhavan and Schneiderman by direct counting in first instar larvae, and they found 37-38 cells (Madhavan and Schneiderman, 1977). As in the embryonic primordia, the P/A compartment ratio was 0.5, which would indicate about 25 cells for the A and 12-13 for the P compartment. Their estimate of the CDT of the first two divisions was 6-7 hours, similar to our measurement. We calculated the initial cell number by an indirect measurement based on the final number of cells in the prepupal disc (see below).

Previous measurements of the final number of cells suggest a value around 50,000 cells (Garcia-Bellido and Merriam, 1971; Graves and Schubiger, 1982). We counted directly the number of cells by using a nuclear-RFP under a ubiquitous promoter. We mounted four prepupal wing discs and made a careful 3D reconstruction using a deconvolution program (for details see Materials and methods). We were able to discriminate each nuclei of the wing imaginal disc with high accuracy (see Fig. S3C-G in the supplementary material). Then, we divided the epithelia in squares and made an estimate of cell number. The four discs yielded similar values and we obtained an average number of 30,350±1400 cells (Fig. 5B) of which 18,750±1160 belonged to the A compartment and 11,600±320 to the P compartment. Considering that the total number of cell divisions was 9.1, it suggests that the initial anterior polyclone would have 34 cells and the posterior 21.

Predictions of the computer simulation and comparison with experimental results

The simulation program was built with the following assumptions: (1) *M⁺* and *M/+* cells divide at their own rate; (2) each compartment will stop growing once it has reached the stereotyped final number of cells; (3) cell divisions are asynchronous; (4) during development, cells adjust their CDT in accordance with the size of the compartment at each moment and the stipulated final size, as imposed by the logistic function that governs growth of animal tissues (Bryant and Simpson, 1984).

A key simulation would be that of a compartment containing one *M⁺* cell and the remainder *M/+*. It would represent the expected contribution of a single *M⁺* clone growing together with, but independent of, the surrounding *M/+* cells. Given the stochastic conditions of the cell cycle used in the simulation, every event renders slightly different results. Examples for a single *M⁺* clone growing in an anterior and in a posterior compartment are shown in Fig. 5C. The computer simulation consistently gave a figure of about 45-50% as the average contribution of a single *M⁺* clone in both cases (Fig. 5D), which fits well with the experimental results. This finding strongly supports the conclusion that *M/+* and *M⁺* cells proliferate independently. The computer simulations predict that very few *M⁺* clones would cover a large portion of the disc (see Fig. S4A in the supplementary material). This probably accounts for the cases reported in the literature of *M⁺* clones covering the majority of the compartment. For clones initiated later in development (72 hours BPF), the computer simulations also predict values that turned out to be very similar to those obtained experimentally (see Fig. S4B in the supplementary material).

We also performed computer simulations considering different parameters of cell death during development: the number of dying cells and the time needed for apoptotic cells to disappear after they show caspase activity. The results are shown in Fig. S4C in the supplementary material. They can be summarised by saying that only very high levels of apoptosis would have a significant effect on *M⁺* clone size. For example, assuming that apoptosis affects one out of every three *M/+* cells surrounding *M⁺* clones and that it takes the cells 8 hours to disappear, the average *M⁺* clone size would be 70.5% of the compartment. By contrast, the measurements of apoptosis associated with *M⁺* clones oscillated between 1/20 and 1/24 (Fig. 1). We also modified other parameters, such as the time needed for the apoptotic cells to disappear, also shown in Fig. S4 in the supplementary material.

Compartments containing M^+ clones are ahead in development

The computer simulation also predicts that $M/+$ compartments containing an M^+ clone should reach the final arresting size earlier than compartments constituted only by $M/+$ cells. If an $M/+$ compartment is expected to finish development by 168 hours, the average of several events of compartments with individual M^+ clones is about 148 hours, a difference of 20 hours. As a consequence of the faster growth rate of the M^+ clones, those compartments should be ahead in their developmental progression and hence would arrest growth earlier.

One way to test this prediction is to compare the developmental progression of compartments of the same disc in which one compartment contains an M^+ clone and the other does not. To monitor the progression we used the activity levels of the genes *vestigial* (*vg*) and *wingless* (*wg*), the expression patterns of which evolve during development so they can be used to compare relative developmental stages (see Martin and Morata, 2006). We dissected discs from early or mid-third instar $M/+$ larvae and considered only those cases in which one disc contained an M^+ clone and the other wing disc of the same larva did not. The latter was used as control. As can be seen in Fig. 6A,A', the expression of *vestigial* in the anterior compartment of a wing disc containing an M^+ clone was at that stage more advanced than in the posterior compartment of the control disc. Similarly, *wg* expression was more advanced in the compartment containing an M^+ clone (Fig. 6B,B'). These results indicate that the presence of an M^+ clone accelerates the development of the compartment. This effect should be reflected in the time needed to reach the final arresting size.

Moreover, these compartments containing large M^+ clones can be used to study the cell autonomy of the compartmental expression of developmental genes such as *vg* or *wingless* (Kim et al., 1996; Ng et al., 1996; Whitworth and Russell, 2003; Williams, 1994). As illustrated in Fig. 6D, the border of some M^+ clones intersect the *vg* domain, splitting it into M^+ and $M/+$ territories. It can be observed that the developmental stage of *vg* expression was the same in the M^+ and $M/+$ territories. This is an indication that, like the

mechanism governing compartment size, the process controlling developmental progression does not operate cell-autonomously, but at the whole compartment level. It may well be that it is the same process controlling the developmental progression of the disc and that that arrests growth once the final compartment dimension has been reached.

DISCUSSION

The main objective of this work was to study the role of cell competition in regulating growth and size in the wing disc of *Drosophila*. As the disc is composed of two (A and P) compartments, which behave as independent units of size control (Martin and Morata, 2006), our experiments refer to mechanisms operating within compartments.

To make some precise statements about the growth dynamics of the disc we have calculated several developmental parameters, some of which had not been described in detail in previous publications. According to our data, the wing disc starts growth with about 55 cells, of which 34 would belong to the A and 21 to the P compartment. The final cell number is around 30,000 (about 19,000 A and 11,000 P). The total number of cell divisions is about 9.1. These estimates coincide well with previous ones (García-Bellido and Merriam, 1971; Graves and Schubiger, 1982), although the final number of 30,000 cells is somewhat lower than previous measurements.

We show here, in agreement with previous results (James and Bryant, 1981; Neufeld et al., 1998), that the growth rate of the wild-type wing disc changes markedly through development: during the second larval period M^+ cells divide at about 5.5–5.7 hours per cycle, then the length of the cell division cycle increases as development progresses, and in the second half of the third larval period it is as high as 30 hours (Fig. 5). Thus most of the growth occurs during the second and early third larval period. We find a similar growth pattern in $M/+$ discs, the CDT of which increases from 10–12 hours in the second larval period to 34–40 at the prepupal stage. It is not surprising that the major difference between wild-type and $M/+$ discs occurs during the early periods. Possibly the metabolic demand is greater in fast-proliferating cells and therefore the limitation in protein synthesis of $M/+$ cells is more noticeable.

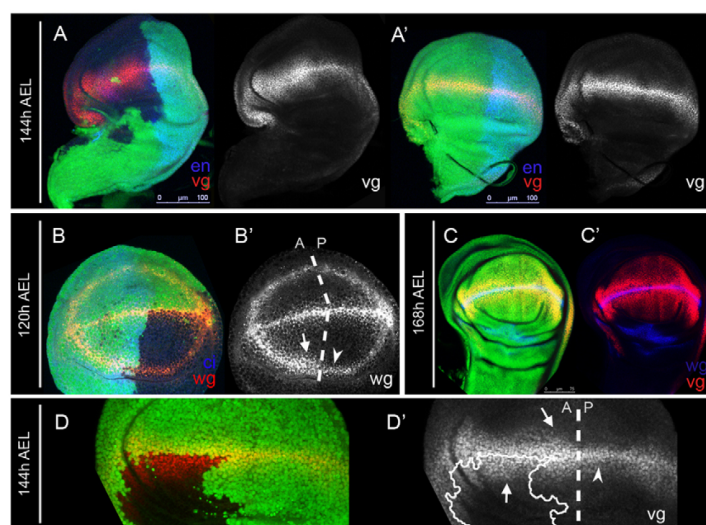


Fig. 6. Effect of the presence of an M^+ clone on the developmental progression of a compartment.

(A,A') Two wing discs from the same mid-third instar larva, fixed 144 hours after egg laying. They are stained for *engrailed* (blue) and *vestigial* (red). The A disc contains an M^+ clone (marked by the loss of GFP) in the anterior compartment, whereas the A' disc does not. Note that *vg* expression is more advanced in the anterior compartment. The expression of *vg* in the posterior compartment of the A disc is like that in the A' disc. (B,B') Early third instar wing disc, stained for *wg* activity, containing an early M^+ clone in the posterior compartment. The development of the posterior compartment (arrowhead) is more advanced than in the anterior compartment (arrow), as indicated by the more sharply defined *wg* expression. (C,C') An $M/+$ prepupal disc showing mature expression of *wg* (blue) and *vg* (red). (D,D') Wing disc harbouring an M^+ clone in the anterior compartment that splits it into M^+ and $M/+$ territories (arrows). Note that *vg* expression is more advanced in the anterior compartment, but within the compartment it is equally advanced in the M^+ and $M/+$ territories.

Cell competition and growth control in the wing disc

Normally there is little apoptosis in the wing disc (Milan et al., 1997); therefore, cell competition cannot have a major role in normal circumstances. Nevertheless, it may be a safeguard mechanism to eliminate abnormal cells or to deal with unusual situations such as cells with different division rates, which may interfere with the growth of the disc. We have examined the significance of these events of cell competition in the overgrowth of M^+ clones and in the control of compartment size.

The fact that M^+ clones growing in $M/+$ discs can reach an average size more than ten times their normal size (when they grow in a M^+ disc) while not altering the final size of the compartment, suggested that both clone overgrowth and size control may depend on cell competition. In this view the M^+ clones would overgrow at the expense of the elimination of neighbouring $M/+$ cells. Moreover, the removal of the latter would ensure that they do not produce progeny that would give rise to an excess of cells in the compartment.

However, our experiments indicate that cell competition does not play a significant role in these processes; in the absence of cell competition, the M^+ clones are able to overgrow as much as in the normal situation (Figs 2 and 3). Besides, the size of compartments is not affected by the presence of these clones, even though they can occupy the larger part of the compartment.

In our view, the key element to explain these results is the mechanism that controls the overall size of the compartment and that arrests growth once it has reached the final dimension. This mechanism would function without regard to the lineage of the cells or of their relative contribution to the final structure. It would also function autonomously in each compartment (Martin and Morata, 2006).

Let's consider a compartment containing M^+ and $M/+$ cells from early in development. The cells proliferate at the rate dictated by their metabolic activity, according to their *Minute* genotype, and their division rate is not affected by interactions with neighbour cells. Because of their proliferation advantage the M^+ cells occupy a large part of the compartment. In principle, if the $M/+$ cells were to proliferate at their normal rhythm for the whole duration of the $M/+$ larval period, the sum of the contribution of the M^+ and $M/+$ cells would produce an excess of tissue. The reason why this is not the case is that the size control mechanism arrests growth as soon as the final size has been reached. In the presence of a large M^+ clone the final arresting size of the compartment is reached *earlier* than in a one entirely made of $M/+$ cells. For this reason the $M/+$ cells contribute less than they would have in the absence of a M^+ clone. That is, the developmental delay associated with the $M/+$ condition is partially abolished by the presence of the M^+ clone. This is predicted by the computer simulation and is supported by our results. Using the expression of the *vg* and *wg* genes to monitor the developmental stage of the compartment, we find that compartments with M^+ clones are ahead and are therefore expected to reach the final arresting size earlier than those that are entirely $M/+$ (Fig. 6).

The existence of a non-cell-autonomous mechanism governing the growth of the compartment is also suggested by our observations about *vg* expression in compartments containing M^+ clones. As shown in Fig. 6D,D', M^+ clones can sometimes split the *vg* domain into M^+ and $M/+$ territories. The significant finding is that both territories show the same pattern of expression. This very strongly suggests that the control of *vg* expression is determined by an overall mechanism probably measuring the size of the compartment in each moment and regardless of the individual lineages.

The physiological role of cell competition

What, then, is the role of cell competition? Cell competition results from interactions between two types of viable cells and causes the elimination of one of them. That is, it is a mechanism to remove viable cells that are not developmentally adapted to the growing tissue. Unlike other situations that cause apoptosis, the 'loser' cells in the competition process are not necessarily damaged; they are poor competitors. In the cases reported here, it is the relatively slow proliferating cells that are eliminated, which may have a beneficial effect on the general fitness of the disc (Moreno et al., 2002). Nevertheless, there may be other safeguard functions of greater biological significance. Cell competition may be instrumental in removing viable but developmentally abnormal cells, which, for instance, do not interpret developmental cues correctly (Milán et al., 2002). This would include tumour or transformed cells that may arise in development. The process would ensure that tumour cells would normally be outcompeted by non-tumour cells. In certain circumstances, however, the acquisition by the latter of some additional property may turn tumour cells into super-competitors, thus reversing the situation. It has been argued that cell competition may be a major factor in tumour progression in circumstances in which tumour cells are able to outcompete normal cells (Moreno and Basler, 2004; Perez-Garijo et al., 2005; Moreno, 2007).

Acknowledgements

We thank Ainhoa Pérez-Garijo for her contributions during the initial experiments; Ernesto Sánchez-Herrero, Jose Casal and Daniel L. Garaulet for critical comments on the manuscript; Markus Affolter, Konrad Basler, Peter Gallant and Pat Simpson for a key discussion; Tetsuya Tabata and Nicholas Baker for fly stocks; Rick Fehon, Duoia Pan and Herman Steller for antibodies; Angelica Cantarero and Rosa González for general help; and the Servicio de Microscopía Óptica y Confocal of the Centro de Biología Molecular for their help. This work has been supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Consolider and BFU-02427), from the Comunidad de Madrid and from an institutional grant from the Fundación Ramón Areces. S.C.H. is supported by a JAE-predoc scholarship.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/136/22/3747/DC1>

References

- Bohni, R., Riesgo, E. J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K. and Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a Drosophila homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865-875.
- Bryant, P. J. and Simpson, P. (1984). Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q. Rev. Biol.* **59**, 387-415.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. (2004). Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-116.
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A. and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell* **130**, 1120-1133.
- García-Bellido, A. and Merriam, J. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **24**, 61-87.
- García-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat. New Biol.* **245**, 251-253.
- González-Gaitán, M., Capdevila, M. P. and García-Bellido, A. (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.* **46**, 183-200.
- Graves, B. and Schubiger, G. (1982). Cell cycle changes during growth and differentiation of imaginal leg discs in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **93**, 104-110.
- Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.
- Huh, J. R., Guo, M. and Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr. Biol.* **14**, 1262-1266.
- James, A. A. and Bryant, P. J. (1981). Mutations causing pattern deficiencies and duplications in the imaginal wing disk of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **85**, 39-54.

- Kim, J., Sebring, A., Esch, J. J., Kraus, M. E., Vorwerk, K., Magee, J. and Carroll, S. B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* **382**, 133-138.
- Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y. and Miura, M. (2006). DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7258-7268.
- Li, W. and Baker, N. E. (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell* **129**, 1215-1225.
- Madhavan, M. M. and Schneiderman, H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal discs and histoblasts nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Archives* **183**, 269-305.
- Martin, F. A. and Morata, G. (2006). Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **133**, 4421-4426.
- Martin, F. A., Pérez-Garijo, A. and Morata, G. (2008). Apoptosis in *Drosophila*: compensatory proliferation and undead cells. *Int. J. Dev. Biol.* **52** (in press).
- Marygold, S. J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G. H., Harrison, P. M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T. C. et al. (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol.* **8**, R216.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 640-645.
- Milán, M., Campuzano, S. and García-Bellido, A. (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5691-5696.
- Milán, M., Perez, L. and Cohen, S. M. (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing. *Dev. Cell* **2**, 797-805.
- Morata, G. and Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-221.
- Moreno, E. and Basler, K. (2004). dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-129.
- Moreno, E., Basler, K. and Morata, G. (2002). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* **416**, 755-759.
- Neufeld, T. P., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A. and Edgar, B. A. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93**, 1183-1193.
- Ng, M., Díaz-Benjumea, F. J., Vincent, J. P., Wu, J. and Cohen, S. M. (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* **381**, 316-318.
- Oertel, M., Menthena, A., Dabeva, M. D. and Shafritz, D. A. (2006). Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **130**, 507-520.
- Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarle, S. A. and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development* **131**, 3907-3920.
- Pérez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-5598.
- Pérez-Garijo, A., Martin, F. A., Struhl, G. and Morata, G. (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17664-17669.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T. and Steller, H. (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev. Cell* **7**, 491-501.
- Tyler, D. M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B. and Baker, N. E. (2007). Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* **175**, 643-657.
- Udan, R. S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C. and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* **5**, 914-920.
- Whitworth, A. J. and Russell, S. (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* **254**, 277-288.
- Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K. and Carroll, S. B. (1994). Organization of wing formation and induction of a wing patterning gene at the dorsal-ventral compartment boundary. *Nature* **368**, 299-305.
- Wilson, R., Goyal, L., Ditzel, M., Zachariou, A., Baker, D. A., Agapite, J., Steller, H. and Meier, P. (2002). The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 445-450.

Differential division rates and size control in the wing disc

Ginés Morata* and Salvador C. Herrera

Centro de Biología Molecular CSIC-UAM; Madrid, Spain

We have generated wing disc compartments that contain marked fast growing M^+ clones surrounded by slow dividing $M/+$ cells. Under these conditions the interactions between fast and slow dividing cells at the clone borders frequently lead to cell competition. However, our assay suppressing apoptosis indicates that cell competition plays no major role in size control. We argue that cells within a compartment proliferate according to their genotype independently of each other and that their contribution to the final structure will depend solely on their proliferation rate. This model is supported by a computer simulation that predicts values similar to those found experimentally. Our results on the growth of M^+ clones within compartments and on the expression of developmental genes like *vestigial* and *wingless* suggest the existence of a non-cell autonomous mechanism that functions at the level of the entire cell population. It measures the population size in each moment, determines the corresponding expression levels of developmental genes and establishes the time to arrest growth.

Introduction and Historical Background

One major and still unresolved question in Biology is the mechanism that ensures that different body organs achieve the right size and then stop growth. This issue has been experimentally addressed in many model organisms.¹⁻³ As for many other biological problems, *Drosophila* is a convenient system to look into this problem. And within *Drosophila* the imaginal discs offer the advantage that many

growth and other relevant developmental parameters are well known after many years of studies. We deal here with the issue of size control in the wing disc, in connection with the dynamics of growth of the disc and the phenomenon of cell competition. We extend some of the ideas presented in a recent publication.⁴

For a better comprehension of the problem it is convenient to consider the history of the experiments and ideas involved. A key factor was the development during the late sixties/early seventies of the past century of methods to trace the lineage of the imaginal discs.^{5,6} These methods relied on X-Ray induced mitotic recombination to induce clones of cells homozygous for cuticular markers. The study of the frequency and size of clones initiated at different developmental stages provided important information about the growth dynamics of the imaginal discs. These were the only structures studied with these methods because the marker mutants used could only be scored in the adult cuticle.

The wing disc was the most thoroughly analysed with these methods.^{5,6} It was found that it grows essentially during the larval period, starting at the end of the first instar and finishing shortly after the initiation of pupariation. The initial number of cells was about 40–50 and the final number about 50,000. Assuming that all cells contribute equally to the final disc, it would mean that each cell contributes with 1,000 cells to the final structure through about 10 divisions. Our recent work⁴ confirms these values, with some relatively minor discrepancies. One important observation was that all the disc cells proliferate roughly at the same rate, since clone sizes were relatively homogenous.

Key words: wing disc, compartments, cell competition, apoptosis, M^+ clones, size control

Submitted: 01/29/10

Accepted: 02/15/10

Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/fly/article/11516

*Correspondence to: Ginés Morata;
Email: gmorata@cbm.uam.es

Addendum to: Martin FA, Herrera SC, Morata G. Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 2009; 136:3747–56; PMID: 19855017; DOI: 10.1242/dev.038406

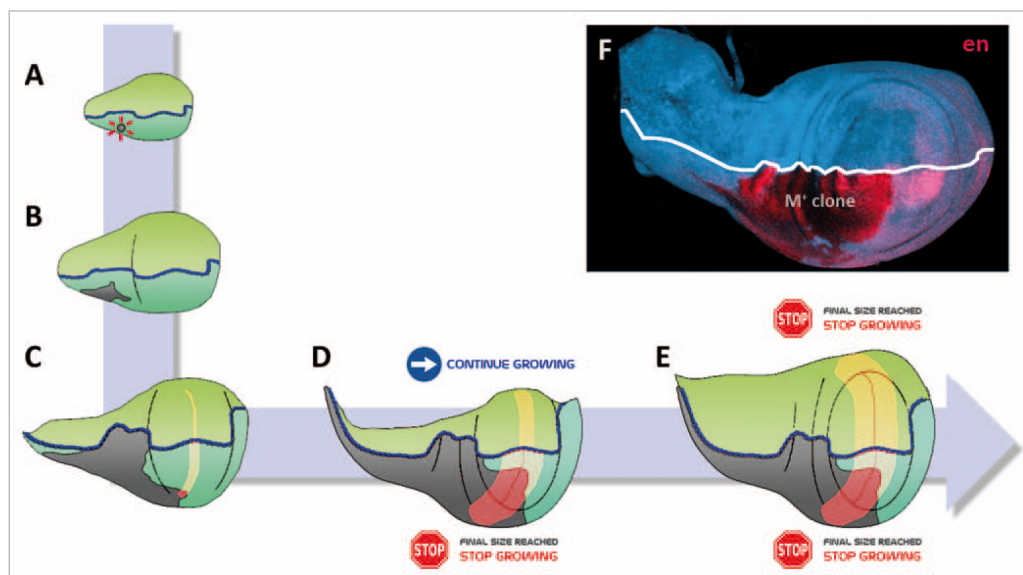


Figure 1. The figure illustrates our view of some key events during the growth of an early M^+ clone (dark gray) in the posterior compartment of a $M/+$ wing disc. The anterior compartment is labelled green and the posterior turquoise. The blue line represents the A/P compartment boundary. The clone was induced during the first larval period (A), and because of its high growth rate, it covers a substantial part of the posterior compartment by early third instar (C). Due to the contribution of the M^+ clone the posterior compartment is proportionally bigger than the anterior compartment. At that time the *vestigial* gene is expressed in a thin band (red/yellow) of cells in the dorso-ventral boundary. By mid third instar (D), because of the high proliferation rate of the M^+ cells, the posterior compartment has already reached the final size and stops growing. Meanwhile the sister anterior compartment is smaller and continues growing. Interestingly, the expression of *vestigial* is more advanced in the posterior compartment, as indicated by the broader domain, and within the posterior compartment it is equally expressed in the M^+ and $M/+$ territories, suggesting that its expression is determined by a supra cellular mechanism. By late third instar (E) the anterior compartment reaches final size and stops growth. The image in F is a photograph of a disc with an early M^+ clone (lacking the blue marker) covering about half the compartment and delineating in part the A/P compartment border. The posterior compartment is labelled red with anti-Engrailed antibody.

The introduction of the Minute technique⁷ represented a major advance in lineage studies: it consisted of a modification of the mitotic recombination method that allowed experimental manipulation of cell division rates during development. It was based on the finding that the division rate of cells is autonomously dependent on the doses of *Minutes* (hereto after referred as *M*), a group of genes encoding ribosomal proteins.⁸ Cells with two doses (wildtype, M^+) divide faster than cells with one ($M/+$) dose. The original report of the method included two different experiments: (I) induction of fast dividing M^+ clones surrounded by slow dividing $M/+$ cells and conversely, (II) induction of slow dividing $M/+$ clones surrounded by fast dividing M^+ cells.

There were several significant observations from these experiments.

An important one was that although M^+ clones in experiment I could occupy large part of the disc derivatives, they could not cross over certain boundary lines. This demonstrated the existence of lineage modules (compartments). The detailed study of the developmental potential of these clones led to the formulation of the compartment hypothesis.^{9,10} The compartmentalization process has been reviewed many times and is not central to this report.

In addition, there were two other observations that are relevant to size control. First, it was found that individual M^+ clones generated in experiment could fill the greater part of a compartment and yet compartment size remained normal. This indicated, as noted by Crick and Lawrence,¹¹ that there is a size control mechanism that can cope with different

division rates. It seemed clear that if a single clone makes up to say 50% of the compartment (see Fig. 1F), the rest of the cells had to have their progeny adjusted so that the final size is normal.

The second observation was that clones of slow-dividing cells generated in experiment II were eliminated after 24 hours. This was very surprising because those $M/+$ cells were viable—flies of the $M/+$ genotype used were viable and fertile. The implication was that the slow dividing $M/+$ cells were eliminated because they were within the same population with fast dividing M^+ cells. Somehow they could not compete with M^+ cells, hence the term cell competition. The phenomenon implicated a cellular interaction between two types of viable cells that resulted in the elimination of one type. It was shown later that out competed $M/+$ cells are

eliminated by apoptosis mediated by the JNK pathway.¹²

Overgrowing M^+ Clones, Cell Competition and the Control of Size

The study of the dynamics of the overgrowth of M^+ clones and the possible role of cell competition controlling size was the aim of our recent work.⁴ All our results were referred to compartments since there is evidence¹³ that anterior and posterior compartments are autonomous units of growth.

The experiments inducing overgrowing M^+ clones are relevant to study size control because the presence of these clones is forcing the control mechanism, which has to cope with cells with very different division rates. A M^+ clone occupying 50% of the compartment without affecting compartment size poses an important question: assuming that the founder M^+ cell arose within a group of 20 $M/+$ cells, it would mean that the remaining 19 would together contribute 50%, about half of what they would have normally contributed. How is this regulation achieved?

An obvious possibility would be a mechanism such as cell competition, which eliminates $M/+$ cells: as a M^+ clone grows its cells would interact successively and induce apoptosis in neighbor $M/+$ cells. The end result would be a compartment of normal size composed of a majority of cells of the M^+ clone, just as observed. It is implicit in the model that the M^+ clones overgrow at the expense of out-competed $M/+$ cells. The observation¹⁴ that there are $M/+$ cells in apoptosis located close to the borders of overgrowing M^+ clones supported this view. We confirmed this finding in our own experiments.⁴

A simple way to test this idea was to analyse the growth of M^+ clones and their effect on compartment size in the absence of cell competition (apoptosis). If it were to play a role in maintaining normal size, it would be expected that its suppression would produce an excess of cells in the compartment: the progeny of $M/+$ cells that have not been eliminated. The result is that the suppression of cell competition has no detectable effect on compartment size. Moreover, M^+ clones overgrow as

much as they do in normal circumstances, indicating that they do not overgrow at the expense of the elimination of $M/+$ cells. Further, the growth rate of M^+ clones in $M/+$ wings is the same as in M^+ wings. Taken together these results establish that cell competition has no significant role in size control. The cell interactions detected at border of the M^+ clones^{4,14} are irrelevant with regard to size control.

The picture that emerges from these experiments is that cells with different division rates proliferate autonomously, without establishing regulatory interactions with their neighbors. How much they contribute to the final structure will solely depend on their capacity to grow. The M^+ clones contribute so much simply because their cells divide faster than $M/+$ cells.

Pursuing the idea that the contribution of M^+ and $M/+$ cells would simply be an automatic consequence of their respective division rates, we hypothesized that we could build a computer simulation able to mimic the *in vivo* situation (it can be downloaded from <http://bacterio.cbm.uam.es:8080/scherrera/simulations.zip>). It incorporated the basic growth parameters of the wing disc, such as initial and final number of cells and proliferation rates of M^+ and $M/+$ cells in different developmental stages. Some of these parameters were calculated *de novo*. We also obtained a precise estimate of the average size of individual M^+ clones generated at the time the disc starts growth. It turned out to be 50% of the entire compartment (actually, 48% in the anterior and 53% in the posterior compartment).

The predictions from the computer simulation about the expected size of unique M^+ clones growing in a $M/+$ compartment fit very well with the experimental observations, in strong support of the hypothesis that different cell lineages develop autonomously.

A Non-Cell Autonomous Mechanism Controlling Overall Development of the Wing Disc?

The experiment of inducing M^+ clones in the absence of apoptosis rules out a significant role of cell competition in size control, but at the same time emphasizes the problem posed by the M^+ clones, especially

after our demonstration that wing cells proliferate autonomously. Which is the mechanism that integrates overgrowing M^+ clones within the frame of a normal size compartment?

In our opinion, as illustrated in **Figure 1**, the answer lies in the mode of action of the mechanism that arrests growth once a compartment has reached final size. As pointed out above, this mechanism is compartment autonomous,¹³ but it is non-cell autonomous, since it integrates cell lineages that contribute differently to the final size. Moreover, it does not count number of cell divisions because M^+ cells divide many more times than $M/+$ cells.

The key idea is that the presence of an overgrowing M^+ clone in a $M/+$ compartment causes an early growth arrest, as compared with a sister $M/+$ compartment, e.g., the other anterior or posterior compartment present in the same disc. The high growth rate of the M^+ clone generates more cells, and as a consequence it reaches the final arresting size ahead of the sister compartment. If the $M/+$ cells were to proliferate at their normal rate for the *whole duration* of the $M/+$ larval period, the sum of the contributions of the M^+ and $M/+$ cells would produce an excess of tissue. But it is prevented by the early growth arrest of the affected compartment. This hypothesis implies that the development of a $M/+$ compartment containing a M^+ clone is more advanced than one without. It also implies that there should be a time in which the $M/+$ compartment with a M^+ clone has stopped growth whereas the sister $M/+$ compartment is still growing. We assayed the expression of *vestigial* (*vg*) and *wingless* (*wg*) genes to monitor the developmental progression of these compartments. It is known that the expression patterns of these genes evolve during development,^{15,16} and this feature can be used to monitor the progression of disc compartments.¹³ As illustrated in **Figure 1** the compartment with the M^+ clone is more advanced and therefore will arrest growth ahead of the compartment without it.

We know nothing about the nature of this mechanism, except that it appears to work at the level of the entire cell population. Growth inducers like Dpp¹⁷⁻¹⁹ or growth suppressors like the Hpo pathway²⁰

do not show significant functional alterations at the time of growth arrest, thus they do not seem to be directly involved. It has been suggested^{21,22} the existence of growth inhibitory mechanical forces that derive from the non-uniformity of growth inducers like Dpp. The disc will stop growth when the inhibitory forces due to mechanical stress are able to counteract growth inducers. The principal difficulty with these models is that they do not consider that growth is independently regulated in anterior and posterior compartments. It is not easy to see how general mechanical forces should discriminate individual compartments.

Some of our observations may indicate that the size control mechanism may be a manifestation of a more general phenomenon controlling the overall developmental process in the disc. This is suggested by our observation (also illustrated in Fig. 1) that the advanced expression of *vg* in a compartment with a *M⁺* clone is not autonomous to the clone but it also affects *M/+* cells outside. It may indicate that the control of *vg* expression is determined by an overall mechanism measuring the size of the compartment in each moment and regardless of the individual

lineages. It is tempting to speculate the same mechanism is governing the expression of developmental genes and is also in charge of determining the moment in which growth stops.

References

1. Conlon I, Raff M. Size control in animal development. *Cell* 1999; 96:1-3.
2. Day SJ, Lawrence PA. Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 2000; 127:2977-87.
3. Leavers SJ, McNeill H. Controlling the size of organs and organisms. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:604-9.
4. Martin FA, Herrera SC, Morata G. Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 2009; 136:3747-56.
5. Bryant PJ, Schneiderman HA. Cell lineage, growth, and determination in the imaginal leg discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1969; 20:263-90.
6. Garcia-Bellido A, Merriam JR. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1971; 24:61-87.
7. Morata G, Ripoll P. Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* 1975; 42:211-21.
8. Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, et al. The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 2007; 8:216.
9. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalization of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 1973; 245:251-3.
10. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalization in the dorsal mesothoracic disc of *Drosophila*. *Dev Biol* 1976; 48:132-47.
11. Crick FH, Lawrence PA. Compartments and polyclones in insect development. *Science* 1975; 189:340-7.
12. Moreno E, Basler K, Morata G. Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 2002; 416:755-9.
13. Martin FA, Morata G. Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 2006; 133:4421-6.
14. Li W, Baker NE. Engulfment is required for cell competition. *Cell* 2007; 129:1215-25.
15. Whitworth AJ, Russell S. Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 2003; 254:277-88.
16. Kim J, Sebring A, Esch JJ, Kraus ME, Vorwerk K, Magee J, et al. Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by *Drosophila* vestigial gene. *Nature* 1996; 382:133-8.
17. Burke R, Basler K. Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* 1996; 122:2261-9.
18. Martin-Castellanos C, Edgar BA. A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* 2002; 129:1003-13.
19. Martin FA, Perez-Garijo A, Moreno E, Morata G. The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development* 2004; 131:4921-30.
20. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. Hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003; 114:445-56.
21. Aegerter-Wilmsen T, Aegerter CM, Hafen E, Basler K. Model for the regulation of size in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech Dev* 2007; 124:318-26.
22. Hufnagel L, Teleman AA, Rouault H, Cohen SM, Shraiman BI. On the mechanism of wing size determination in fly development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:3835-40.

